Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. Kochsiek

AUSSCHEIDUNG VON ^{14}C-HEXOBARBITAL METABOLITEN IN GALLE UND URIN BEI VERSUCHSTIEREN MIT BEGINNENDER GALAKTOSAMIN-HEPATITIS

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Jörg Buschmann
aus Essen

Würzburg, 14.05.1981

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. K. Kochsiek

AUSSCHEIDUNG VON ^{14}C-HEXOBARBITAL METABOLITEN IN GALLE UND URIN BEI VERSUCHSTIEREN MIT BEGINNENDER GALAKTOSAMIN-HEPATITIS

Inaugural-Dissertation

verfaßt und der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg
zur
Erlangung der medizinischen Doktorwürde

vorgelegt von

Jörg Buschmann
aus Essen

Würzburg, 14.05.1981

Referent: Prof. Dr. med. Ernst RICHTER

Korreferent: Prof. Dr. med. Kurt KOCHSIEK

Dekan: Prof. Dr. med. Karl-Heinrich WULF

Tag der mündlichen Prüfung: 30.06.1981

Gedruckt mit Genehmigung der Hohen Medizinischen Fakultät der Universität Würzburg

UNIV. LEIDEN BIBL.

Hanna und Annette gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543512_0103

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
I	EINLEITUNG	1
II	ABKÜRZUNGEN	8
III	MATERIAL UND GERÄTE	9
IV	METHODEN	11
	1. Tierhaltung und Ernährung	11
	2. Auslösung der experimentellen Erkrankung und der Enzyminduktion	11
	3. Operationstechnik und Versuchsdurchführung	12
	4. Bestimmung der Serumwerte	14
	5. Aufarbeitung von Galle und Urin	15
	6. Auswertung der Dünnschichtchromatographie	16
	7. Versuchsmethoden zur Charakterisierung der polaren Metaboliten	17
	8. Statistische Berechnungen	20
V	METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN	21
	1. Identifizierung der Metabolite auf der DC-Platte	21
	2. Charakterisierung der polaren Metaboliten	22
VI	ERGEBNISSE	27
	1. Leberfunktionsproben	27
	2. Gallensäureausscheidung in Galle und Urin und Gallensäurekonzentration im Serum	27
	3. Serumkonzentrationen von Hexobarbital und HB-Metaboliten	28
	4. HB-Metabolitenmuster in Galle und Urin	36
	5. Ausscheidung von HB-Metaboliten in Galle und Urin	38
	6. Prozentualer Anteil polarer und unpolarer HB-Metaboliten an der Ausscheidung in Galle und Urin	38

Seite

7. Absolute Menge polarer und unpolarer HB-Metabolite in Galle und Urin 39

8. Gesamtausscheidung von HB-Metaboliten 40

VII DISKUSSION 52

VIII ZUSAMMENFASSUNG 60

IX LITERATURVERZEICHNIS 61

I. EINLEITUNG

Als größtes Einzelorgan des menschlichen Körpers nimmt die Leber im Intermediärstoffwechsel eine zentrale Rolle ein. Ein großer Teil ihrer Aufgaben besteht in der Inaktivierung, Entgiftung und Ausscheidung körpereigener und fremder Substanzen. Die dazu notwendigen Stoffwechselprozesse richten sich auf eine Erhöhung der Polarität der Metabolite vorwiegend durch oxidative Schritte und eine Anhebung des Molekulargewichtes durch Konjugatbildung. Dadurch wird eine Verbesserung der Exkretionsfähigkeit in die Galle erreicht.

Bei Lebererkrankungen kann die Ausscheidung gallepflichtiger Substanzen auf verschiedenen Ebenen gestört sein. Vorstellbar ist eine gesonderte Beeinflussung der Aufnahme in die Leberzelle, des intrazellulären Transportes, des Metabolismus und der Ausscheidung in die Galle. Hierzu einige exemplarische Beispiele:

1. Bei einem Teil der Patienten mit Gilbert-Meulengracht-Syndrom liegt eine Störung der Aufnahme von Bilirubin durch die Hepatozyten vor (22). Untersuchungen von SCHARSCHMITT u. Mitarb. (34) und SCHWENK u. Mitarb. (35) begründen die Annahme eines Einschleusungsvorganges im Sinne eines erleichterten Transportes für organische Anionen, der einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Bilirubin, Bromsulphthalein und ICG zeigen hier eine gegenseitige kompetitive Hemmung. Widersprüchlich bleiben Untersuchungen über den hemmenden Effekt von Gallensäuren auf diesen Mechanismus (25,45). Die Ergebnisse lassen jedoch einen weiteren getrennten Aufnahmemechanismus vermuten.

2. Die cytoplasmatischen Proteine, Y (Ligadin) und Z, spielen im intrazellulären Transport eine wichtige Rolle. Sie sind in der Lage, große Mengen organischer Anionen zu binden und scheinen dadurch dem oben angegebenen Transportmechanismus eine Richtung zu geben. Es wurde darüber hinaus nachgewiesen, daß Ligandin mit der Glutathion-S-Transferase B identisch ist, dem Enzym, das

u. a. Bromsulphthalein mit Glutathion konjugiert (11,29). Der Gehalt an Y und Z Protein in der Leberzelle wird durch Substanzen erhöht, die eine Proliferation des glatten ER bewirken mit der Konsequenz, daß z. B. die Verschwinderate von Bromsulphthalein aus dem Plasma und seine Anreicherung in der Leber erhöht ist (29). Gegensinnige Veränderungen werden erreicht, wenn der Y - Z-Protein-Gehalt der Leberzelle vermindert ist, wie dies z. B. bei Cholestase durch Äthinylöstradiol, bzw. CCl_4-Intoxikation der Fall ist (16,29).

3. Das Cytochrom P-450 nimmt im arzneimittelabbauenden Enzymsystem der mischfunktionellen Oxidasen eine Schlüsselstellung ein. Substanzen, wie Phenobarbital oder 3-Methylcholantren bewirken eine Zunahme des P-450-Gehaltes in der Leberzelle im Sinne einer Enzyminduktion. Dies bewirkt eine Steigerung der Metabolisierung und Ausscheidung von exogenen Substanzen, wie z. B. Dicumarol, Methadon, Chloramphenicol und Bromsulphthalein (3,32,39,46). Andererseits sind dihydroxilierte Gallensäuren in der Lage, in vitro Cytochrom P-450 kompetitiv zu hemmen und in höheren Konzentrationen zu zerstören (15).

4. Weitgehend unklar sind Vorgänge, die den Transport von Stoffwechselprodukten von ihrem Bildungsort in der Leber in die Galle bewirken. Phenobarbital erhöht vorwiegend die gallensäureunabhängigen Fraktionen (37). Lithocholsäureeinfusionen bewirken bei der Ratte eine Erhöhung des Cholesterol/Phospholipidverhältnisses in den Grenzmembranen der Gallencanaliculi. Dies wiederum bewirkt eine Verbreiterung der hydrophoben Zone in der Membran und eine Herabsetzung der Wasserpermeabilität, was zur Cholestase führt (18). Taurocholsäure fördert die Bildung von Gallesäuremicellen und steigert die Ausscheidung von ICG mit den Micellen. Dehydrocholsäureinfusionen verursachen eine ausgeprägte Cholerese mit geringer Micellenbildung und fördern primär die Ausscheidung von Bromsulphthalein im Vergleich zu anderen organischen Anionen (44).

Gallensäuren

Beispielhaft für einen komplexen Stoffwechselzusammenhang ist das Verhalten der Gallensäuren. Einerseits selber Abbauprodukt des Cholesterins, stehen sie andererseits im Dienste der Aufnahme und Ausscheidung von Substanzen im Rahmen des enterohepatischen Kreislaufes.

Lebern von gesunden Ratten enthalten 70 µg Gallensäuren pro g Leber. Zwei Drittel davon bilden trihydroxylierte GS (ß-Muricholsäure 10 %, Cholsäure 60 %). Der Rest sind dihydroxylierte GS mit je 15 % Desoxycholsäure und Chenodesoxycholsäure und 5 % Hyodesoxycholsäure. 80 % der GS sind nicht konjugiert, 20 % liegen als Taurin- und Glycinkonjugate vor (8,42).

Eine besondere Bedeutung erhalten die GS durch die Tatsache, daß sie in der Lage sind, in einem bestimmten Verhältnis zueinander und mit Cholesterin und Phospholipiden Micellen zu bilden. Auf der einen Seite wird hierdurch ihre osmotische Wirkung herabgesetzt, andererseits scheinen die Micellen jedoch in der Lage zu sein, organische Anionen an sich zu binden und dadurch ihre Ausscheidung zu steigern (33,44). Nach ihrem enterohepatischen Kreislauf stehen sie erneut für diese Aufgabe als Transportmittel zur Verfügung (38).

Die vorliegende Arbeit betrachtet den Metabolismus von Hexobarbital im tierexperimentellen Modell einer Lebererkrankung, der Galaktosamin-Hepatitis. Phenobarbitalvorbehandelte Tiere stellen eine zweite Kontrollgruppe dar.

Hexobarbital-Metabolismus

Hexobarbital findet häufig Verwendung zur Untersuchung des arzneimittelmetabolisierenden Enzymsystems. Die Gründe dafür sind ein niedriges Molekulargewicht (236,3), ausreichende Apolarität,

schnelle Metabolisierung im Versuchstier und eine leicht zugängliche Ausscheidung der Abbauprodukte im Urin (2).

Durch Untersuchungen von HOLCOMB u. Mitarb. (14) ist bekannt, daß als Hauptmetabolite 3'-hydroxy-HB (19 %/Dosis) und 3'-Keto-HB (59 %/Dosis) im Urin ausgeschieden werden. Daneben erscheinen in ganz geringem Umfang HB und Nor-HB (weniger als 1 % der Dosis). In Untersuchungen von VERMEULEN u. Mitarb. (43) wird ein Epoxid-Diol-pathway für Hexobarbital beim Menschen und bei der Ratte beschrieben. Danach finden sich im Urin von Versuchstieren weniger als 0,5 % der Dosis 1',2'-Epoxid-HB und 10 % der Dosis 1,5 Dimethylbarbitursäure. Das Diol des HB ist im Urin wegen seiner Instabilität nicht nachweisbar (Abb. 1). Insgesamt erscheinen 95 % der Dosis im Urin, nur 4 % werden mit den Faeces ausgeschieden.

Untersuchungen am Menschen haben ergeben, daß der HB-Metabolismus bei Patienten mit akuter Hepatitis und bei Patienten mit Leberzirrhose eingeschränkt ist. Bemerkenswerterweise findet sich nach klinischer Erholung von einer akuten Hepatitis eine über längere Zeit andauernde Einschränkung des HB-Metabolismus.

Enzyminduktion mit Phenobarbital

In zahlreichen Untersuchungen wurde gezeigt, daß die Vorbehandlung mit Phenobarbital zu einer Stimulierung der Hydroxylierung, Glucuronidisierung- und Demethylisierungsvorgängen führt. Zusätzlich ist der Gallefluß erhöht und die Leberdurchblutung gesteigert. Mit unterschiedlicher Betonung beschleunigen diese Faktoren die Elimination einer Reihe exogener Substanzen (3,32,39,46).

Als Grundlage dieser Veränderungen zeigen sich elektronenoptisch neben einer Vermehrung der freien Ribosomen im Zytoplasma der Hepatozyten hauptsächlich eine deutliche Zunahme des glatten ER, am stärksten ausgeprägt in der Läppchenperipherie. Zellkerne,

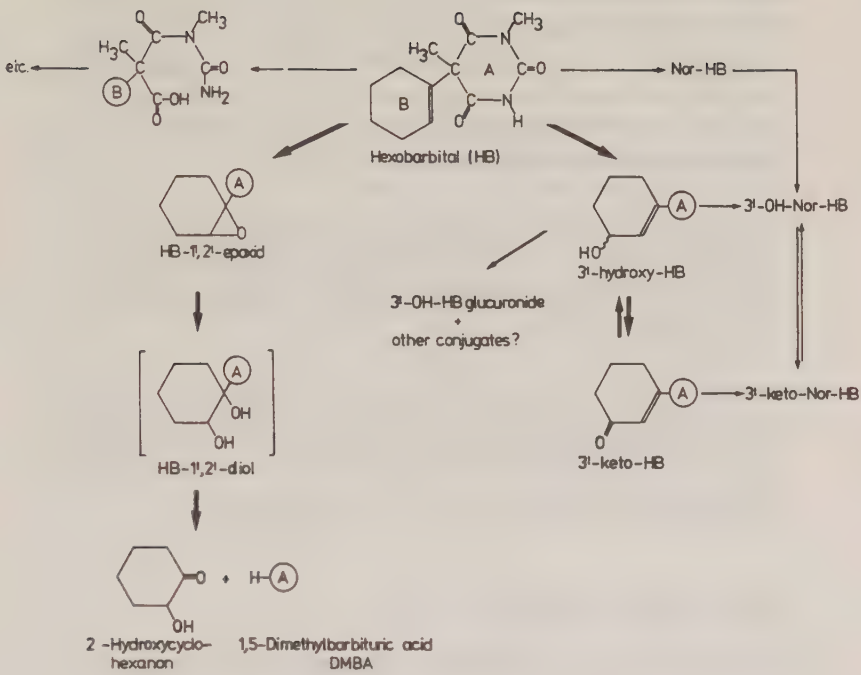

Abb. 1 Schematische Darstellung des Hexobarbital (HB)-Metabolismus

Mitochondrien und rauhes ER scheinen nicht verändert zu sein (1,30).

Einer Erhöhung des Lebergewichtes bei Versuchstieren nach Phenobarbitalvorbehandlung entspricht eine Zunahme des mikrosomalen Proteingehaltes. Ferner ist die Aktivität der Aminopyrin-Demethylase, der Anilin-Hydroxylase und der Cytochrom P-450-Gehalt der Leberzelle deutlich erhöht, was gleichbedeutend mit einer Zunahme der mischfunktionellen Oxydasen ist (21,26).

Der Zuwachs an Cytochrom P-450 scheint vornehmlich auf einer gesteigerten Synthese zu beruhen, während die Abbaurate erst in Anpassung an ein erhöhtes Niveau des Hämoproteingehaltes zum Ausgleich ansteigt (7).

Der choleretische Effekt von Phenobarbital scheint nicht in einer Erhöhung der gallensäureabhängigen Gallefraktion zu liegen, sondern über eine Stimulierung der Na-K-aktivierten ATPase eine Zunahme der gallensäureunabhängigen Fraktionen zu verursachen (37).

Galaktosamin-Hepatitis

Eine einmalige i.p.-Injektion von 500 mg/kg KG Galaktosamin verursacht beim Versuchstier schon nach relativ kurzer Zeit (16 - 18 Std.) ein Krankheitsbild, das einer Virushepatitis beim Menschen sehr ähnlich ist. Histologisch findet man bei diesem von REUTTER und KEPPLER (28) erstmals beschriebenen experimentell ausgelösten Krankheitsbild Einzelzell- und Herdnekrosen im Leberparenchym, entzündliche Infiltrate in den periportalen Feldern, sowie eine Vermehrung der Kupffer'schen Sternzellen (19,28). Als Frühzeichen der zellulären Schädigung sieht man elektronenoptisch schon nach wenigen Stunden Vakuolen mit autolytischem Material, Granula im Zytoplasma, geschädigte Mitochondrien, Fetttröpfchen und eine Hypertrophie des glatten ER (20,23,28).

Als klinischen Ausdruck der Hepatitis zeigen die Laboruntersuchungen des Blutes bereits nach 16 - 18 Stunden einen Anstieg der leberspezifischen Enzyme im Serum, eine Verminderung des Gesamt-Proteins und einen Abfall der Gerinnungsfaktoren (9,28).

Zahlreiche Untersuchungen wurden zur Pathogenese der Galaktosamin-Hepatitis durchgeführt. Eine hauptsächliche Ursache scheint demnach zu sein, daß Galaktosamin an Uridylphosphat gekoppelt wird, mit dem Ergebnis, daß ein Mangel an Substrat für die Biosynthese von UDP-Glukose, bzw. UDP-Galaktose entsteht. Somit ist es möglich, daß sowohl der Uridylatmangel, als auch die Anhäufung von Galaktosaminmetaboliten, wie Galaktosamin-1-Phosphat, UDP-Galaktosamin, UDP-Glucosamin etc., toxisch sein können (4,27,36). Zusätzlich dazu besagen Untersuchungen von GRÖN u. Mitarb. (10), daß durch Galaktosamin freigesetzte intestinale Endotoxine und Anaphylaxine in der Pathogenese der Galaktosamin-Hepatitis eine bedeutende Rolle spielen.

Mit der vorliegenden Arbeit soll versucht werden, folgende Fragen zu klären:

- Welches Verteilungsmuster haben HB-Metaboliten in Galle und Urin?
- Welche quantitativen Änderungen zeigen die einzelnen Versuchsgruppen?
- Werden bei der Galaktosamin-Hepatitis oder nach Vorbehandlung mit Phenobarbital andersartige Metabolite gebildet?
- Gibt es bei der Galaktosamin-Hepatitis eine kompensatorisch-alternative Ausscheidung über die Niere von Metaboliten, die sonst über die Galle ausgeschieden werden?

II. ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
AP	Alkalische Phosphatase
Ci	Curie
cpm	counts per minute
DC	Dünnschichtchromatographie
% Dosis	% der applizierten Dosis
E	Extinktion
ER	Endoplasmatisches Retikulum
G	Gallefraktion
Gal	Galaktosamin
GCH	Glykocholsäure
GCHDCH	Glykochenodesoxycholsäure
Ges.E.	Gesamteiweiß
GPT	Glutamat-Pyruvat-Transaminase
GS	Gallensäure(n)
HB	Hexobarbital
ICG	Indocyaningrün
ip	intraperitoneal
KG	Körpergewicht
µ	mikro = 10^{-6}
n	Anzahl der Tiere pro Versuchskollektiv
n.s.	nicht signifikant, $p > 0{,}05$
Pheno	Phenobarbital
Tab.	Tabelle
Upm	Umdrehungen pro Minute

III. MATERIAL UND GERÄTE

Versuchstiere

Männliche Ratten, Stamm FW 49, Firma Thomae, Biberach/Riss

Substanzen

Hexobarbital	Evipan-Na, Fa. Bayer, Leverkusen
^{14}C-Hexobarbital	NEC-653 Cyclohexenyl-3,5 Dimethylbarbitursäure, New England Nuclear, Boston/Mass.
Ringerlösung	nach DAB 7
physiol. NaCl-Lösung	Fa. Fresenius, Bad Homburg
Galaktosamin	D-Galaktosamin HCl purissimum, Fa. K. Roth, Karlsruhe
HCl 1 n	Fa. Merck, Darmstadt
Äthanol p.a.	"
Äther p.a.	"
Propanol p.a.	"
25 % Ammoniaklösung p.a.	"
Szintigel	Fa. K. Roth, Karlsruhe
Trockenfutter	Altromin Haltungsdiät, Altromin GmbH Lage/Lippe
Furosemid	Lasix^{R}, Fa. Hoechst AG, Frankfurt
Monitrol	Moni-Trol, DADE Division American Hospital Supply Corp.

Testansätze

Bilirubin	Nr. 15944	Biochemica Testkombinationen
GPT	Nr. 15956	Fa. Boehringer, Mannheim
AP	Nr. 15987	

Gallensäurenbestimmung	Glycocholic Acid RIA-Kit, Glycochenodesoxycholic Acid RIA-Kit, Fa. Nordiclab, Oulu/Finnland
Biuret Reagenz	Kalium-Natrium-Tartrat, 0,2 n NaOH, $CuSO_4$ $5H_2O$, Kaliumjodid

Geräte

Radioaktivitätsmessung	Tri-Carb Scintillations-Spectrometer, Modell 3380, Fa. Packard, Frankfurt
Photometer	Eppendorf Photometer 1101 M, Fa. Eppendorf, Gerätebau, Hamburg
Statistische Berechnungen	Wang Kleincomputer, Modell 700 B, Fa. Wang Laboratories, Frankfurt
Zentrifuge	Heraeus-Christ GmbH, Typ UJ 2
Präzisionswaage	Fa. A. Sauter KG, Ebingen
Temperaturmeßgerät	NAC Corporation, San Diego, Californien
Infusionspumpe	Unita I, Fa. Braun, Melsungen
DC-Platten	DC-Fertigplatten SIL G-25 20 x 20 cm, Schichtdicke 0,25 mm, Kiselgel, Fa. Merck AG, Darmstadt
Katheter	Portex Lim., Hythe/Kent

IV. METHODEN

1. Tierhaltung und Tierernährung

Die bei den Versuchen verwendeten 225 - 300 g schweren männlichen Ratten des Stammes FW 49 wurden in Käfigen zu jeweils 5 Stück gehalten. Verfüttert wurde Altromin Standard Diät, Leitungswasser wurde ad libitum beigegeben. Konstante Luftfeuchtigkeit, eine Raumtemperatur von 25°C und ein normaler Tag/Nacht-Rhythmus waren gewährleistet.

2. Auslösung der experimentellen Erkrankung und der Enzyminduktion

2.1. Galaktosamin-Hepatitis

Durchschnittlich 16 Std. vor dem jeweiligen Versuch erhielten die Tiere 500 mg/kg Körpergewicht Galaktosamin gelöst in 2 ml physiologischer Kochsalzlösung i.p. injiziert.

2.2. Phenobarbital-Vorbehandlung zur Enzyminduktion

An fünf aufeinander folgenden Tagen erhielten die Tiere Phenobarbital in nachstehenden Konzentrationen i.p. gespritzt:

50 mg/kg Körpergewicht
60 mg/kg "
70 mg/kg "
80 mg/kg "
80 mg/kg "

Die eigentliche Versuchsdurchführung fand 48 Std. nach der letzten Injektion statt.

3. Operationstechnik und Versuchsdurchführung

3.1 Operation

In leichter Äthernarkose wurden die Femoralgefäße in einer Leistenbeuge dargestellt. Die Gefäße wurden mobilisiert und mit zwei Zwirnschlingen und Klemmen aus dem umgebenden Gewebe herausgehoben. Zwischen den Schlingen wurde die gestaute vena femoralis mit einer Gefäßschere von medial eröffent, ein Teflonkatheter etwa 3 cm eingeschoben, die beiden Ligaturen zugezogen und die Infusion angeschlossen. Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 5 ml/Std.

Im Anschluß daran wurde die Bauchhöhle eröffnet, von der Symphyse bis zum processus xiphoideus. Der ductus choledochus wurde vom Duodenum aus aufgesucht und etwa in der Mitte zwischen duodenaler Einmündung und Leberpforte mit einer feinen Schere eingeschnitten. Vom Einschnitt aus wurde ein Teflonkatheter (Außendurchmesser 1 mm) bis zur Leberpforte vorgeschoben.

Danach wurde die Blase, die sich während der laufenden Infusion gefüllt hatte, am Scheitel angeschlungen. Um den Blasenkörper selbst wurden zwei lose Ligaturen gelegt. Nach vorsichtiger Inzision am Blasenscheitel wurde ein weiterer Teflonkatheter eingelegt und die beiden Ligaturen zur Abdichtung zugezogen. Zusätzlich wurde die Blase zur Volumenverringerung und damit besseren Füllung des Katheters nach kranial gestreckt. Zur Vermeidung einer längeren Äthernarkose bemühten wir uns, die Operationsdauer von 20 - 25 Minuten nicht zu überschreiten.

3.2 Anordnung und Durchführung des Versuchs

Während des ganzen Versuchs wurde das operierte Tier aus etwa 75 cm Entfernung mit Rotlicht bestrahlt, um Wärmeverluste zu verhindern. Temperaturmessungen erfolgten im Bauchraum in regelmäßigen Abständen, wobei darauf geachtet wurde, daß die Körpertemperatur der Tiere nicht unter 35°C absank.

Die bei der Kanülierung des Gallenganges aus dem Bauchraum herausgenommenen Eingeweide wurden vorsichtig reponiert und mit Zellstoff abgedeckt, der mit Ringerlösung ständig befeuchtet wurde. Dadurch wurde ein Austrocknen verhindert.

Zur Stützung des Kreislaufes und zur Anregung des Urinflusses erhielt jedes Tier während des Versuches eine Infusion folgender Zusammensetzung:

Ringerlösung	13,5 ml
20 % Glucose	6,5 ml
Aqua p. inject.	20,0 ml
Furosemid	32 mg

Die Infusionsgeschwindigkeit betrug 5 ml/Std. entsprechend einer Furosemiddosis von 4 mg/Std. Gallensäuren wurden nicht substituiert.

Sofort nach Beendigung der Operation wurde den Versuchstieren 100 mg/kg KG Hexobarbital zusammen mit 5 µCi ^{14}C-Hexobarbital mittels einer Tuberkulinspritze intraduodenal injiziert und die Äthernarkose beendet. In Abständen von 15, 30, 45 und 60 Minuten post injectionem wurden Proben von Galle und Urin in abgedeckten Eppendorfgläschen gesammelt. Zur Bestimmung von ^{14}C-HB und HB-Metaboliten wurde am Ende jeder Viertelstunde Blut aus der Schwanzspitze des Tieres entnommen. Nach Abnahme der 60 Minutenprobe wurden die Tiere durch Punktion der Bauchaorta entblutet.

4. Bestimmung der Serumwerte

Das aus der Bauchaorta gewonnene Blut (5 - 7 ml) wurde anschließend 10 Minuten bei 5 000 Upm zentrifugiert und das Serum abpipettiert.

4.1 Proteinbestimmung im Serum

Die Bestimmung des Gesamtproteins im Serum erfolgte mittels Biuretreaktion nach folgendem Verfahren:

a) Versuchsansatz: 0,1 ml Serum
5,0 ml physiologische Na-Cl-Lösung
5,0 ml Biuret-Reagenz

b) Leerwert: 5,0 ml physiologische NaCl-Lösung
5,0 ml Biuret-Reagenz

c) Standard: 0,1 ml Monitrol (≙ 7,0 mg Prot.)
5,0 ml physiologische NaCl-Lösung
5,0 ml Biuret-Reagenz

Die Lösungen blieben 30 Min. bei Raumtemperatur stehen, dann wurde im Eppendorf-Photometer bei 546 nm die Extinktion gemessen.

Die Berechnung des Proteingehaltes erfolgte nach der Formel:

$$\text{Proteingehalt im Serum} = \frac{7{,}0 \times \triangle \text{ E Probe}}{\triangle \text{ E Standard}} \left[\text{g Prot./100 ml Ser.}\right]$$

4.2 Bestimmung des Bilirubingehaltes, der alkalischen Phosphatase und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase

Der Bilirubingehalt, die Aktivität der alkalischen Phosphatase und der GPT des Serums wurden mit der angegebenen Testkombination der Firma Boehringer, Mannheim, im Eppendorf-Photometer 1101 M bestimmt.

4.3 Bestimmung der Gallensäuren

In Galle, Urin und Serum wurden die Gallensäuren bestimmt, die mit den RIA-Testkits der Firma Nordiclab, Finnland, wie Glykochol- und Glykochenodesoxycholsäure reagieren.

4.4 Bestimmung des Gehaltes von ^{14}C-HB und HB-Metaboliten im Serum

Das in viertelstündlichen Fraktionen aus der Schwanzspitze der Versuchstiere gewonnene Blut wurde zentrifugiert, das Serum abpipettiert. 10 µl Serum wurden mit 20 ml Szintigel der Firma Roth, Karlsruhe, gemischt und in den Flüssigkeits-Szintillationsspektrographen zum Zählen eingesetzt. Das Ergebnis wurde anschließend auf 1 ml Serum umgerechnet und in % der applizierten Dosis/ml Serum ausgedrückt.

5. Aufarbeitung von Galle und Urin

5.1 Bestimmung der Konzentration von ^{14}C-HB-Metaboliten in Galle und Urin

Das Galle- und Urinvolumen der ausgeschiedenen Portion wurde durch Wiegen der Probe auf einer Präzisionswaage bestimmt, wobei das

spezifische Gewicht von Galle und Urin = 1,0 g/ml gesetzt wurde.

10 µl jeder Probe wurde mit 20 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrographen gezählt. Aus dem Ergebnis konnte die in jeder Probe enthaltene Radioaktivität und damit die Menge von HB-Metaboliten bestimmt werden.

5.2 Trennung der HB-Metabolite durch Dünnschichtchromatographie

Kieselgelplatten der Firma Merck, Darmstadt, mit einer Schichtdicke von 0,25 mm wurden zur Auftrennung der in der Galle und im Urin befindlichen Metabolite verwendet. 10 µl natives Material jeder Probe wurden mit einer Eppendorfpipette aufgetragen.

Die Entwicklung der Platten erfolgte in Desaga-Kammern bei einer Umgebungstemperatur von + 4 °C. Für jede Entwicklung wurde als Fließmittel 200 ml eines Gemisches von

15 Vol. % 0,4 n NH_4OH
85 Vol. % n - Propanol

verwendet. Die Laufzeit betrug bei einer Laufstrecke von 14,5 cm und konstanten Temperaturverhältnissen im Mittel 8 Stunden. Eine Stunde vor Beginn der Entwicklung wurden die Kammern zur Temperaturangleichung in die Kühlkammer gestellt.

6. Auswertung der Dünnschichtchromatographie

Nach der Entwicklung wurden die Platten 10 Min. bei 70°C getrocknet. Jede Laufstrecke einer Probe wurde in Felder von 2 x 1 cm, beginnend 1 cm unterhalb der Auftragstelle abgekratzt. Das gewonnene Material wurde zusammen mit 2 ml 50 % Äthanol in Zählgläschen gegeben, mit 18 ml Szintillationsflüssigkeit gemischt und im Flüssigkeits-Szintillations-Spektrographen gezählt.

Die Zugabe des Äthanols erwies sich als notwendig, um insbesondere den polaren Metaboliten aus dem Kieselgel zu extrahieren.

Nach Abzug der Leerwerte (40 cpm) ergaben die Meßwerte ein Laborprotokoll wie in Abb. 2 dargestellt. Definitionsgemäß wurden Metaboliten mit einem Rf-Wert $\leq$ 0,5 als polare HB-Metabolite, mit einem Rf-Wert $\geq$ 0,5 als unpolare HB-Stoffwechselprodukte bezeichnet. Geringe Schwankungen dieses Grenzwertes ergaben sich aus nicht ganz exakt reproduzierbarer NH_4OH-Konzentration im Fließmittel. Die Summe der cpm im Bereich der polaren und unpolaren Metaboliten wurde für jede Fraktion auf die in der gesamten Fraktion enthaltenen Anzahl cpm umgerechnet. Die Summe dieser Werte ergibt die Anzahl der ausgeschiedenen cpm/Std. Als Verhältnis zur eingesetzten Dosis ergibt sich die prozentuale Ausscheidung für die Dauer einer Stunde.

7. Versuchsmethoden zur Charakterisierung der polaren Metaboliten

7.1 Neomycin-Vorbehandlung

Nach der von El-HAWARI u. Mitarb. (5) beschriebenen Methode erhielten 3 Tiere 4 Tage lang 2mal täglich jeweils 50 mg/kg KG Neomycinsulfat in 1 ml Ringerlösung per Schlundsonde. 3 Kontrolltiere erhielten zur gleichen Zeit 1 ml Ringerlösung per Schlundsonde. Am 5. Tag erhielten alle Tiere oral die gleiche Menge gepoolter Galle, die ^{14}C-HB-Metaboliten in bekannter Aktivität enthielt. Bestimmt wurde die über 24 Std. im Urin ausgeschiedene Menge von ^{14}C-HB-Metaboliten.

Lauf-strecke cm	Laborprotokoll nach DC von je 10 µl Galle cpm				cpm in der gesamten Fraktion				cpm/h ausge-schieden	% Dosis/h 100 % = 19 911 500 cpm	HB-Metabolit µg/h/100 g KG
	G 1	G 2	G 3	G 4	G 1 171µl	G 2 246µl	G 3 248µl	G 4 190µl			
1	3	7	17	23	14364						
2	6	42	195	389		98621					
3	2	29	200	502			144113				
4	5	42	972	1190				106001	363 099	1,84	184
5	7	1041	2019	1322						≙ 87,3 %	
6	218	880	372	376							
7	93	1038	1601	1535							
8	506	930	435	242							
9	15	32	58	102	4942						
10	41	108	181	175		17515			57 661	0,27	27
11	186	419	481	399			21353			≙ 12,7 %	
12	47	153	141	53				13851			

POLAR

UNPOLAR

Abb. 2 Berechnungsbeispiel für die Ausscheidung von polaren und unpolaren HB-Metaboliten in die Galle bei Kontrolltier Nr. 4

7.2 Säurehydrolyse

Zur Klärung der Frage der hydrolytischen Spaltbarkeit der polaren Metaboliten wurde eine Säurehydrolyse wie folgt furchgeführt:

Die ^{14}C-HB-Metabolit-haltige Galle eines Kontrolltieres wurde mit Salzsäure behandelt. Hierzu wurden zu gleichen Teilen Nativgalle und 0,4 n HCl über 60 Min. bei 95°C inkubiert und wie beschrieben chromatographiert.

7.3 ß-Glucuronidase-Behandlung

In 10 ml Acetatpuffer pH 4,8 wurden 6,25 mg ß-Glucuronidase gelöst. 10 µl dieser Lösung wurden mit 40 µl Galle eines Kontrolltieres versetzt. Zum Vergleich wurden weitere 10 µl Galle mit reinem Acetatpuffer behandelt. Beide Ansätze wurden 30 Min. bei 37°C inkubiert und anschließend wie angegeben chromatographiert.

7.4 Vorbehandlung mit ^{35}S-Sulfat und ^{14}C-Glukose

10 µCi ^{35}S-Sulfat wurde einem Versuchstier 6 Std. vor dem Versuch oral zugeführt. ^{14}C-Glukose mit einer Aktivität von 50 µCi erhielt ein nüchternes Tier oral 2 Std. vor dem Versuch. Im Versuch, der im übrigen wie oben angegeben durchgeführt wurde, fand ausschließlich unmarkiertes Hexobarbital Verwendung.

7.5 Behandlung der polaren Metaboliten mit Äthanol

Der durch DC dargestellte polare Anteil der HB-Metabolite wurde getrennt ausgekratzt und mit 50 % Äthanol vom Kieselgel eluiert. Das Eluat wurde 1 Std. bei 40°C inkubiert, anschließend eingeengt und erneut chromatographiert.

8. Statistische Berechnungen

Die Signifikanzen wurden mit dem t-Test nach Student berechnet. Für einen Teil der Werte in der mit Phenobarbital vorbehandelten Gruppe wurden die 15-Minuten-Fraktionenwerte als Grundlage zur Signifikanzberechnung nach dem U-Test genommen.

V. METHODISCHE UNTERSUCHUNGEN

1. Identifizierung der Metabolite auf der DC-Platte

Die Zusammensetzung des sowohl in der Galle, als auch im Urin auftretenden peaks, der von uns als unpolarer Metabolit bezeichnet wurde (Abb. 3), kann nach anderen Untersuchungen als bekannt angenommen werden.

Keto-HB und HO-HB machen bei gesunden Ratten 80 % der Ausscheidung im Urin aus, während HB und Nor-HB in kaum nennenswertem Umfang auftreten (2,14). Quantitativ entspricht der unpolare Metabolit diesen Angaben.

HEYNEN (13) zeigt, daß das bei der Mikrosomeninkubation von HB ausschließlich entstehende 3'-Hydroxy-HB bei DC mit dem gleichen Laufmittel an die gleiche Stelle läuft, wie unser unpolarer Metabolit.

Da mit dem von uns verwendeten Laufmittel keine Trennung von Keto-HB und HO-HB erfolgt, sind weitere quantitativen Aussagen über die Zusammensetzung des unpolaren Metaboliten nicht möglich.

HOLCOMB beschreibt das Auftreten von polaren HB-Metaboliten in der Galle von Versuchstieren (14). HEYNEN (13) weist bei ANIT-Cholestase im Urin eine bei gesunden Tieren nur geringfügig auftretende polare Metabolitenfraktion nach. Gesicherte Angaben über die stoffliche Zusammensetzung werden nicht gemacht.

2. Charakterisierung der polaren Metaboliten

Wie aus Abb. 3 ersichtlich ist, handelt es sich bei der polaren Metabolitenfraktion wahrscheinlich nicht nur um einen einzigen Metaboliten. Das gleichsinnige Verhalten der Anteile der polaren Fraktion bei Vorliegen einer Galaktosamin-Hepatitis rechtfertigt jedoch vorläufig eine einheitliche Betrachtung. Da die polaren Metaboliten im Urin, im Gegensatz zur Galle, bei gesunden Tieren nur in geringem Maße auftreten und eine nennenswerte Ausscheidung mit den Faeces nicht stattfindet, muß angenommen werden, daß sie einen enterohepatischen Kreislauf durchmachen. Die nach der in IV. 7.1 beschriebenen Methode mit Neomycin vorbehandelten Tiere (n = 3) schieden durchschnittlich nur 71 % der zugeführten, im wesentlichen polaren HB-Metaboliten im Urin aus, im Gegensatz zu durchschnittlich 89 % in der Kontrollgruppe. Ein Einfluß der durch Neomycin zerstörten Darmflora auf das Funktionieren des enterohepatischen Kreislaufs dieser Metaboliten ist daher naheliegend.

Dieser Befund führte zu der Annahme, daß es sich bei dem polaren Metaboliten zumindest teilweise um Konjugate mit Glucuronsäure und Sulfat handeln könnte. Nach der in IV. 7.4 beschriebenen Methodik gelang es jedoch nicht nach DC von Galle ^{14}C- oder ^{35}S-Aktivität auf der DC-Platte an Stellen nachzuweisen, an denen bei Applikation von ^{14}C-HB Hexobarbitalmetaboliten auftraten. Wenn es sich um Glucuronsäurekonjugate gehandelt hätte, wäre dies zu erwarten gewesen.

Ein weiterer Versuch zur Aufklärung der stofflichen Zusammensetzung der Metaboliten wurde durch einen Spaltungsversuch mit ß-Glucuronidase nach dem in IV. 7.3 beschriebenen Verfahren durchgeführt. ß-Glucuronidase spaltet neben Glucuroniden auch Sulfat-Konjugate. Nach DC der Versuchsansätze ließen sich jedoch keine Veränderungen nachweisen, die auf eine spezifische Wirkung der ß-Glucuronidase auf die polaren Metaboliten hindeuten. Dieser Befund macht die Annahme von Glucuronsäure oder Sulfatkonjugaten eher unwahrscheinlich.

Wird die Galle eines Kontrolltieres nach der in IV. 7.2 beschriebenen Methode einer leichten Säurehydrolyse unterworfen, so zeigt sich nach DC (Abb. 4), daß dadurch die Menge der unpolaren Metaboliten um den gleichen Betrag zunimmt, um den die polaren Metaboliten abnehmen.

In einem weiteren Versuch wurden die polaren und unpolaren Metaboliten getrennt rechromatographiert (Methodik siehe IV. 7.5). Die unpolaren Metaboliten trennen sich hier im Vergleich zur Nativgalle besser, wobei der Gipfel mit dem niedrigen Rf-Wert als 3'-HO-HB, der mit dem höheren Rf-Wert als 3'-Keto-HB gedeutet wird (Abb. 5). Die polaren Metaboliten waren jedoch durch die Eluierung vom Kieselgel mit 50 % Äthanol bei 40°C über eine Stunde stark verändert. Während ca. 50 % der polaren Metaboliten an der üblichen Stelle gefunden wurden, befand sich der restliche Anteil an der gleichen Stelle, an der 3'-Keto-HB bei DC auftritt. Dieses Phänomen kann nicht auf die Rechromatographie zurückgeführt werden, da eine zwei-dimensionale Chromatographie von Nativgalle nicht zu diesem Ergebnis führte. Allein die Behandlung mit 50 % Äthanol bei 40°C über den Zeitraum 1 Std. kann für diesen Effekt verantwortlich gemacht werden.

Während Versuche, die polaren Metabolite als Glucuronsäure- oder Sulfatkonjugate zu charakterisieren keine positiven Ergebnisse brachten, zeigte sich andererseits, daß eher geringfügige physikalisch-chemische Einwirkungen in der Lage sind, die polare Fraktion eindeutig zu verändern. Diese Befunde lassen die polaren Metabolite weniger als Konjugationsprodukte erscheinen, sondern legen vielmehr die Vermutung nahe, daß es sich um eine lockere Aggregation der Metaboliten an Gallenbestandteile handeln könnte. Ähnliche Vorstellungen entwickelten SCHARSCHMIDT und SCHMID (33) über die Exkretion von organischen Anionen in Gallensäuremicellen.

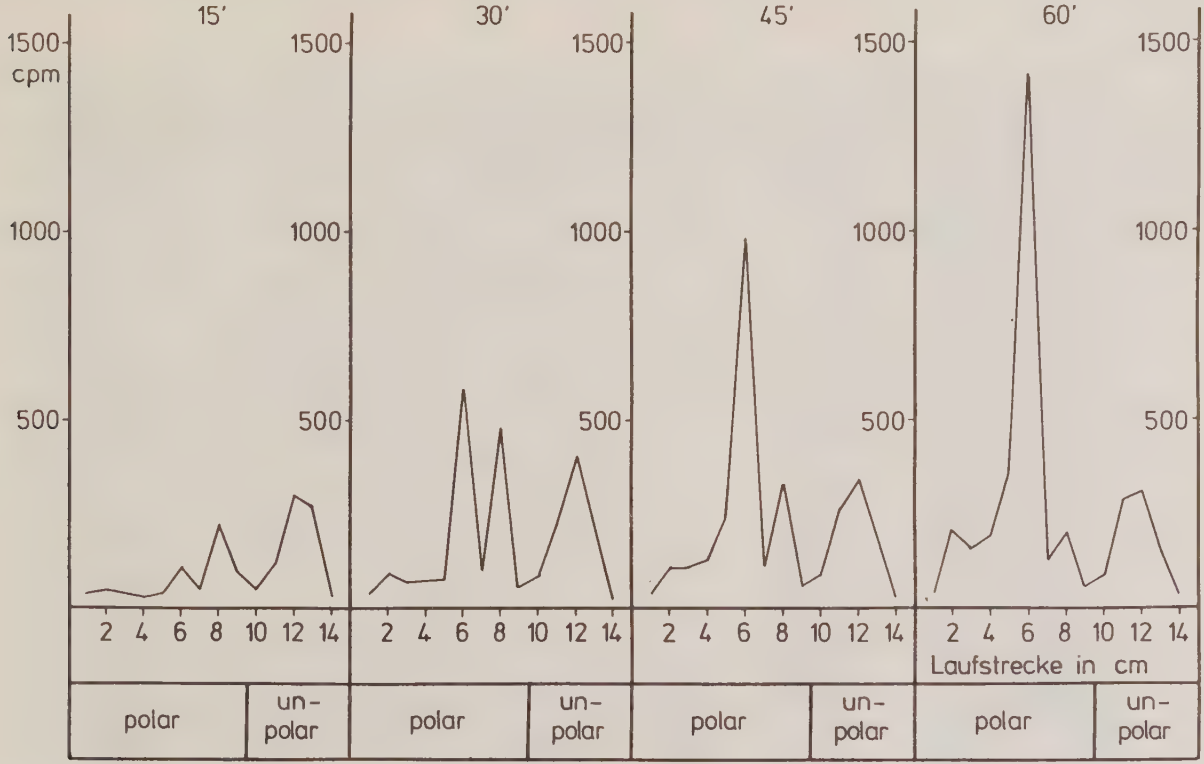

Abb. 3 a Zeitliche Änderung des Metabolitenmusters in der Galle eines Kontrolltieres 15, 30, 45 und 60 Min. nach intraduodenaler Applikation von 100mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB mit anschließender Dünnschichtchromatographie.

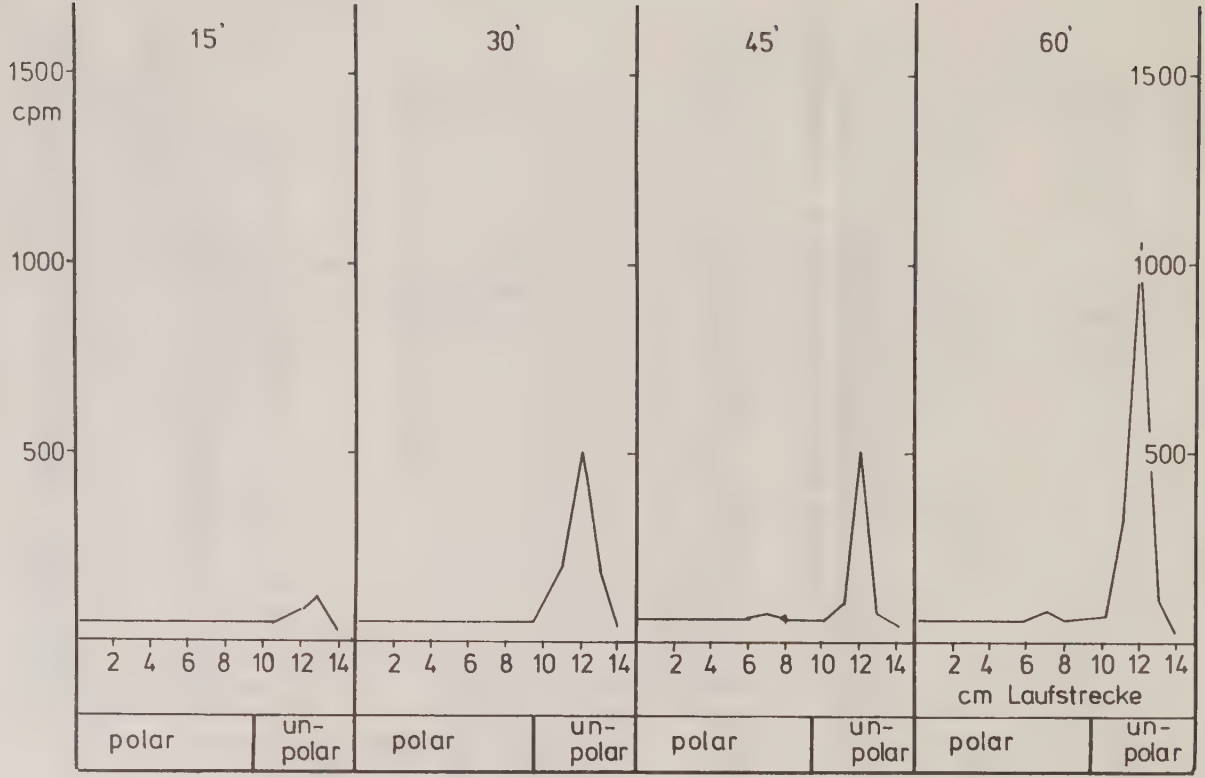

Abb. 3 b Zeitliche Änderung des Metabolitenmusters im Urin eines Kontrolltieres 15, 30, 45 und 60 Min. nach intraduodenaler Applikation von 100 mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB mit anschließender Dünnschichtchromatographie.

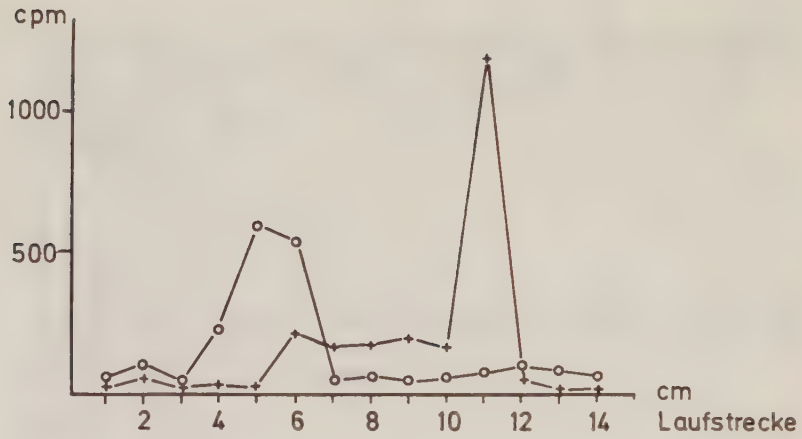

Abb. 4 DC der Galle eines Kontrolltieres nach Gabe von 100 mg/kg KG ^{14}C-HB vor (o) und nach (+) Hydrolyse mit 0,4 n HCl bei 95°C über 60 Min.
Fließmittel: Propanol/ 0,4 n NH_4OH, 85:15 v/v

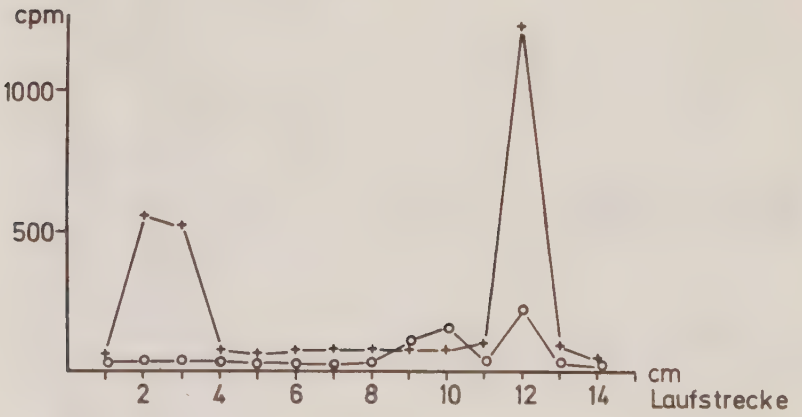

Abb. 5 Getrennte Rechromatographie des polaren (+) und unpolaren (o) HB-Metaboliten nach Vorbehandlung mit 50 % Äthanol bei 40°C über 60 Min.

VI. ERGEBNISSE

Die Rangfolge der Tiere (Tier Nr.) ist in allen Tabellen gleich und wurde nach der Galleproduktion (µl/h/100 g KG) festgelegt (Tab. 8).

1. Leberfunktionsproben

Als laborchemische Parameter wurden Gesamt-Eiweiß, Bilirubin, die Aktivität der alkalischen Phosphatase und der Glutamat-Pyruvat-Transaminase im Serum der Versuchstiere bestimmt.

Außer einer Verminderung des Ges.E. zeigen Tiere, die mit Phenobarbital vorbehandelt wurden (Tab. 3) keine signifikanten Veränderungen gegenüber den Tieren der Kontrollgruppe (Tab. 1).

Wie aus Tab. 2 ersichtlich ist, zeigen die Laborwerte der Tiere mit Galaktosamin-Hepatitis signifikante Veränderungen im Vergleich zu Tieren der Kontrollgruppe oder Tieren mit Phenobarbitalvorbehandlung. So ist das Ges.E. erniedrigt, Bilirubin leicht erhöht, AP sowie die GPT zeigen eine deutliche Erhöhung. Insgesamt gesehen sind diese Daten jedoch Ausdruck einer eher geringfügig ausgeprägten Galaktosamin-Hepatitis.

2. Gallensäureausscheidung in Galle und Urin und Gallensäurekonzentration im Serum

2.1 Galle (Tab. 4)

Die Ausscheidung von GCHDCH ist bei Phenobarbital-vorbehandelten Tieren - statistisch nicht signifikant - erhöht, während die Ausscheidung von GCH auf der gleichen Höhe liegt, wie bei den Kon-

trolltieren. Bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis sind in der Ausscheidung von GCH und GCHDCH keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zum Kontrollkollektiv erkennbar.

2.2 Urin (Tab. 5)

Während sowohl bei Kontrolltieren, Phenobarbital-vorbehandelten Tieren und Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis im Urin keine GCHDCH nachweisbar ist, findet man bei Kontrolltieren und Tieren mit Phenobarbital-Vorbehandlung GCH in geringen Mengen. Tiere mit Galaktosamin-Hepatitis zeigen jedoch eine deutliche Erhöhung der GCH-Ausscheidung um den Faktor 4 - 5.

2.3 Serum (Tab. 6)

Im Serum von Kontrolltieren sind 4,0 µmol/l GCH enthalten, GCHDCH ist nicht nachweisbar. Dagegen konnte bei 2 Phenobarbital-vorbehandelten Tieren GCHDCH nachgewiesen werden. Die Ausscheidung von GCH in diesem Kollektiv ist auf etwa ein Drittel der Kontrollen erniedrigt.

Tiere mit Galaktosamin-Hepatitis zeigen eine deutliche Erhöhung des GCH-Spiegels auf 18,3 µmol/l, während GCHDCH mit 0,31 µmol/l ebenfalls nachweisbar wird.

3. Serumkonzentrationen von HB-Metaboliten

Alle drei Kollektive unterscheiden sich statistisch nicht signifikant. Anhand der in Tab. 7 vorliegenden Zahlen zeigt sich jedoch, daß Tiere mit Galaktosamin-Hepatitis initial signifikant geringere Serumkonzentrationen aufweisen, als Tiere der Kontrollgruppe, bzw. Tiere mit Phenobarbital-Vorbehandlung.

Tier Nr.	KG g	Ges.E. g/100 ml	Bilirubin mg/100 ml	AP U/l	GPT U/l
1	260	6,7	0,20	296	28
2	260	5,6	0,21	366	24
3	290	5,5	0,19	372	24
4	225	5,6	0,17	276	21
5	225	5,7	0,23	292	20
6	230	5,5	0,18	274	23
	248	5,8	0,20	296	23
	± 26	± 0,5	± 0,02	± 36	± 3

Tab. 1 Biologische Daten und Leberfunktionsproben der Tiere des Kontrollkollektivs

Tier Nr.	Gew. (g)	Prot. (g/100 ml)	Bil. (mg/100 ml)	AP (U/l)	GPT (U/l)
1	280	2,66	1,08	-	581
2	330	3,14	0,43	607	540
3	295	3,02	0,42	590	520
4	305	2,66	0,51	585	300
5	225	3,16	0,65	-	296
6	300	3,25	0,39	557	98
	289	2,98	0,58	584	389
	± 35	± 0,26	± 0,26	± 21	± 189
	$p < 0,05$	$p < 0,0005$	$p < 0,005$	$p < 0,0005$	$p < 0,0005$

Tab. 2 Biologische Daten und Leberfunktionsproben der Tiere mit Galaktosamin-Hepatitis, 18 Std. nach i.p.Applikation von 500 mg/kg KG D-Galaktosamin. Signifikanzen im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet.

Tier Nr.	KG g	Ges. E. g/100 ml	Bilirubin mg/100 ml	AP U/l	GPT U/l
1	280	4,2	0,22	354	44
2	290	3,8	0,19	349	35
3	285	3,7	0,22	240	24
4	290	3,7	0,17	202	128
	286	3,9	0,20	286	58
	± 5	± 0,2	± 0,02	± 77	± 48
	$p < 0,025$	$p < 0,001$	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 3 Biologische Daten und Leberfunktionsproben der Tiere mit Phenobarbital-Vorbehandlung. Signifikanzen im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet.

Tier Nr.	Kontrollen		Galaktosamin-Hepatitis		Phenobarbital	
	GCH	GCHDCH	GCH	GCHDCH	GCH	GCHDCH
	nmol/h/100g KG		nmol/h/100g KG		nmol/h/100g KG	
1	2257	119	-	24,5	1435	128
2	2508	710	3412	49,0	1234	558
3	1859	513	1272	85,7	2439	2574
4	-	-	2585	1167	1680	1142
5	2151	192	-	-		
6	1817	328	2014	130		
	2118	372	2320	291	1697	1101
	± 287	± 241	± 905	± 491	± 527	± 1067
			n.s.	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 4 Ausscheidung von Glykocholsäure (GCH) und Glykochenodesoxycholsäure (GCHDCH) in die Galle bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und nach Phenobarbitalvorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv.
Signifikanzen im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet.

Tier Nr.	Kontrollen		Galaktosamin-Hepatitis		Phenobarbital	
	GCH	GCHDCH	GCH	GCHDCH	GCH	GCHDCH
	nmol/h/100g KG		nmol/h/100g KG		nmol/h/100g KG	
1	0,01	0	2,6	0	0,46	0
2	0,0	0	0,4	0	0,12	0
3	0,22	0	1,0	0	0,42	0
4	0,47	0	0,6	0	0,14	0
5	0,81	0	1,2	0		
6	0,0	0	0,4	0		
	0,25	0	1,2	0	0,29	0
	± 0,33		± 0,9		± 0,18	
			$p < 0,025$		n.s.	

Tab. 5 Ausscheidung von Glykocholsäure (GCH) und Glykochenodesoxycholsäure (GCHDCH) in den Urin bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und nach Phenobarbitalvorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv.
Signifikanzen im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet.

Tier Nr.	Kontrollen		Galaktosamin-Hepatitis		Phenobarbital	
	GCH	GCHDCH	GCH	GCHDCH	GCH	GCHDCH
	µmol/l		µmol/l		µmol/l	
1	3,6	0	19,6	0,20	0,1	0,0
2	3,3	0	9,5	0,17	0,8	0,0
3	4,7	0	22,1	0,61	1,6	0,2
4	2,8	0	28,8	0,84	2,7	0,2
5	5,9	0	24,6	0,0		
6	3,6	0	5,2	0,01		
	4,0		18,3	0,31	1,3	0,1
	± 1,1		± 9,1	± 0,34	± 1,1	± 0,1
	± 0,5					
			$p < 0,0025$	$p < 0,05$	$p < 0,005$	$p < 0,05$

Tab. 6 Serumkonzentrationen von Glykocholsäure (GCH) und Glykochenodesoxycholsäure (GCHDCH) bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv.
Signifikanzen im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet

	Tier Nr.	15'	30'	45'	60'	$\bar{s}$
KONTROLLEN	1	0,21	0,23	0,21	0,22	0,22
	2	0,16	0,20	0,21	0,23	0,20
	3	0,30	0,37	0,48	0,34	0,37
	4	0,26	0,36	0,35	0,33	0,33
	5	0,43	0,62	0,55	0,67	0,57
	6	0,41	0,39	0,38	0,32	0,38
		0,30 ± 0,11	0,36 ± 0,15	0,36 ± 0,14	0,35 ± 0,16	0,35 ± 0,13
GAL-HEPATITIS	1	0,14	0,21	0,29	0,31	0,23
	2	0,10	0,15	0,18	0,33	0,19
	3	0,08	0,14	0,18	0,34	0,18
	4	0,25	0,28	0,29	0,34	0,29
	5	0,18	0,28	0,37	0,36	0,29
	6	0,12	0,13	0,14	0,14	0,13
		0,15 ± 0,6 ± 0,03 $p \prec 0,02$	0,20 ± 0,01 ± 0,03 $p \prec 0,05$	0,24 ± 0,09 ± 0,04 $p \prec 0,10$	0,30 ± 0,08 ± 0,03 $p \prec 0,6$	0,22 ± 0,06 ± 0,03 $p \prec 0,1$
PHENOBARBITAL	1	0,31	0,33	0,47	0,41	0,38
	2	0,16	0,21	0,26	0,25	0,22
	3	0,15	0,27	0,29	0,31	0,26
	4	0,17	0,24	0,26	0,29	0,24
		0,20 ± 0,8 ± 0,04 $p \prec 0,2$	0,26 ± 0,05 ± 0,03 $p \prec 0,3$	0,32 ± 0,1 ± 0,05 n.s.	0,32 ± 0,07 ± 0,03 n.s.	0,28 ± 0,07 ± 0,04 n.s.

Tab. 7 Serumkonzentration von HB und HB-Metaboliten in % Dosis/ml Serum bei Versuchstieren mit Galaktosamin-Hepatitis und nach Phenobarbital-Vorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv.
15, 30, 45, 60 Min. nach Applikation von 100 mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB.
Signifikanzen im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet.

4. HB-Metabolitenmuster in Galle und Urin

Abb. 3 a und 3 b (siehe V.1) zeigen exemplarisch das Metabolitenmuster eines Kontrolltieres nach Gabe von 100 mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB in Galle und Urin. Das DC-Verfahren ist in IV. 5. beschrieben. Die Konzentration des unpolaren Metaboliten in der Galle bleibt während des ganzen Versuches annähernd gleich (cm 11 - 13 der Laufstrecke), während im Urin ein Anstieg zu verzeichnen ist. Der polare Metabolit bei cm 8 der Laufstrecke durchläuft in der 30-Min.-Fraktion ein Maximum der Konzentration und nimmt danach wieder ab. Den insgesamt größten Anteil bildet der polare Metabolit bei cm 6 der Laufstrecke. Er nimmt stetig zu. Im Urin treten polare Metaboliten nur in geringem Umfange auf.

Nach Gabe von 500 mg/kg KG Galaktosamin ergeben sich die in Abb. 6 dargestellten Metabolitenverteilungsmuster. Die DC gibt keinen Hinweis darauf, daß bei Galaktosamin-Hepatitis alternative Metabolite gebildet werden. Die Abb. 6 zeigt ferner, daß bei Tieren mit Phenobarbital-Vorbehandlung und Tieren des Kontrollkollektivs keine Änderungen im polaren Metabolitenmuster auftreten, während bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis eine signifikante Verminderung des polaren Anteils in der Galle zu erkennen ist. Im Urin zeigen nur diese Tiere eine mäßige Ausscheidung polarer Metabolite.

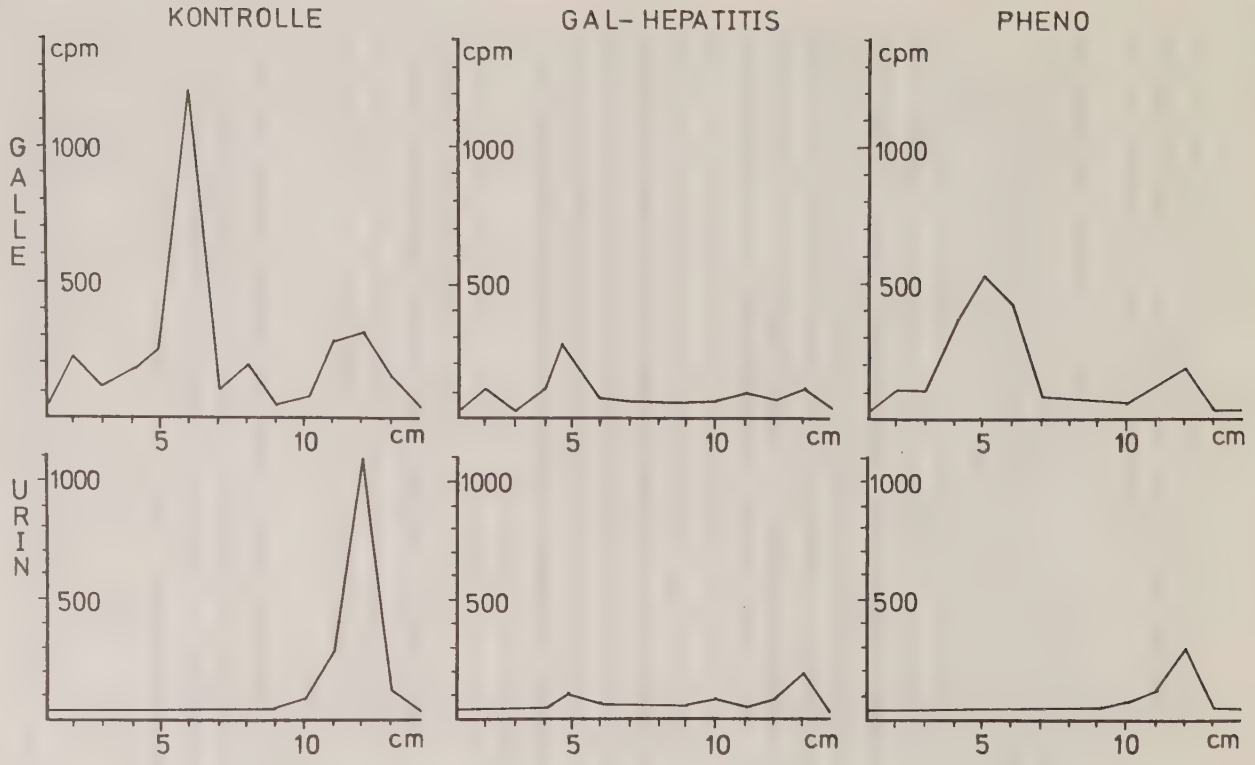

Abb. 6 Metabolitenmuster in der Galle (obere Reihe) und im Urin (untere Reihe) jeweils 60 Minuten nach intraduodenaler Applikation von 100 mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und nach Vorbehandlung mit Phenobarbital im Vergleich zu Kontrolltieren.

5. Ausscheidung von HB-Metaboliten in Galle und Urin (Tab. 8, 9)

Kontrolltiere und Tiere mit Phenobarbital-Vorbehandlung weisen eine etwa gleiche durchschnittliche Galleausscheidung von 406 bzw. 373 µl/h/100 g KG auf. Demgegenüber liegt der Gallefluß 18 Std. nach i.p. Applikation von 500 mg/kg KG Galaktosamin mit 233 µg/h/100 g KG um den Faktor 2 niedriger. Einzelwerte reichen von 83 µl/h/100 g KG bis 381 µl/h/100 g KG. Von der applizierten Dosis von 100 mg/kg KG Hexobarbital scheiden Kontrolltiere und Phenobarbital-vorbehandelte Tiere im Mittel 4,15 % Dosis/h, bzw. 2,06 % Dosis/h aus. Ebenfalls signifikant, jedoch wesentlich stärker eingeschränkt ist die Ausscheidung bei Galaktosamin-Hepatitis. Sie macht nur noch etwa 10 % (0,40 % Dosis/h) der Ausscheidung der Kontrollgruppe aus.

Einer gleichmäßigen Urinproduktion von 500 µl/h/100 g KG bei Tieren der Kontrollgruppe und Tieren mit Phenobarbitalvorbehandlung steht bei Galaktosamintieren eine geringfügig verminderte Urinproduktion von durchschnittlich 304 µl/h/100 g KG und damit offensichtlich gekoppelten geringeren prozentualen HB-Metabolitenausscheidung von 0,42 % Dosis/h gegenüber.

6. Prozentualer Anteil polarer und unpolarer HB-Metaboliten an der Ausscheidung in Galle und Urin (Tab. 10, 11, Abb. 7, 8)

In der Galle von Kontrolltieren und Tieren mit Phenobarbitalvorbehandlung stehen polare und unpolare Metaboliten in einem Verhältnis von 4:1, während bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis polare und unpolare Metaboliten zu annähernd gleichen Teilen ausgeschieden werden.

Kontrolltiere und Phenobarbital-vorbehandelte Tiere scheiden im Urin zu 90 % unpolare Metaboliten aus, während sich bei Tieren

mit Galaktosamin-Hepatitis die Ausscheidung von unpolaren Metaboliten auf etwa 75 % verringert. Die Ausscheidung polarer Metaboliten steht dazu im entsprechenden Verhältnis.

7. Absolute Mengen polarer und unpolarer HB-Metaboliten in Galle und Urin (Tab. 12, 13, Abb. 9, 10)

Nach Applikation von 100 mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB scheiden Kontrolltiere in einer Stunde nach intraduodenaler Gabe 352 µg/h/100 g KG als polare und 63 µg/h/100 g KG als unpolare Metabolite in die Galle aus. Nach Phenobarbitalvorbehandlung verringern sich diese Werte um die Hälfte. Bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis zeigt sich eine signifikante Verringerung der Ausscheidung polarer Metabolite um den Faktor 15 auf 20,6 µg/h/100 g KG, die der unpolaren Metabolite auf etwa 1/3 (19,6 µg/h/100 g KG). Alle drei Kollektive zeigen bei der Ausscheidung des polaren Metaboliten in den Urin annähernd gleiche Verhältnisse, von 4,7 µg/h/100 g KG der Kontrolltiere über 6,0 µg/h/100 g KG der Galaktosamintiere bis 10,3 µg/h/100 g KG der Phenobarbital-vorbehandelten Tiere.

Während bei der Ausscheidung unpolarer Metabolite in den Urin bei Kontrollen und Phenobarbital-vorbehandelten Tieren keine signifikanten Unterschiede auftreten (88,7 bzw. 99,8 µg/h/100 g KG), reduziert sich dieser Anteil bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis auf rund 1/4, d. h. 21,9 µg/h/100 g KG.

8. Gesamtausscheidung von HB-Metaboliten (Tab. 14)

Von einer HB-Dosis von 100 mg/kg KG scheiden Kontrolltiere in einer Stunde 5,09 % in Galle und Urin zusammen aus. Bei Phenobarbital-vorbehandelten Tieren ist dieser Wert nicht signifikant auf 3,16 % verringert. Tiere mit Galaktosamin-Hepatitis scheiden lediglich 1/6 der Dosis, = 0,82 % aus. Während bei Kontrolltieren und Tieren mit Phenobarbitalvorbehandlung die Ausscheidung der polaren (357 bzw. 168 µg/h/100 g KG) und unpolaren Metabolite (151 bzw. 135 µg/h/100 g KG) keinen statistisch signifikanten Unterschied aufweist, sind diese Werte bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis auf 26,6 µg/h/100 g KG für den polaren und 41,4 µg/h/100 g KG für den unpolaren Metaboliten verringert.

Tier Nr.	Kontrollen Gallefluß µl/h/100gKG	Kontrollen ^{14}C-Aktivität % Dosis/h	Galaktosamin-Hepatitis Gallefluß µl/h/100gKG	Galaktosamin-Hepatitis ^{14}C-Aktivität % Dosis/h	Phenobarbital Gallefluß µl/h/100 gKG	Phenobarbital ^{14}C-Aktivität % Dosis/h
1	264	3,22	83	0,10	372	3,41
2	330	3,33	121	0,24	372	1,79
3	342	10,00	169	0,23	373	1,41
4	380	2,11	299	0,63	376	1,63
5	518	2,44	344	0,88		
6	603	3,82	381	0,33		
	406	4,15	233	0,40	373	2,06
	± 128	± 2,93	± 125	± 0,12	± 19	± 0,91
			$p < 0,025$	$p < 0,01$	n.s.	$p < 0,05$

Tab. 8 Galleproduktion und Ausscheidung von HB und HB-Metaboliten in die Galle, berechnet nach der ausgeschiedenen ^{14}C-Aktivität, bei Versuchstieren mit Galaktosamin-Hepatitis und Phenobarbitalvorbehandlung nach Applikation von 100 mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB im Vergleich zum Kontrollkollektiv.
Signifikanzen wurden im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet.

Tier Nr.	Kontrollen Urinprod. µl/h/100gKG	Kontrollen ^{14}C-Aktivität % Dosis/h	Galaktosamin-Hepatitis Urinprod. µl/h/100gKG	Galaktosamin-Hepatitis ^{14}C-Aktivität % Dosis/h	Phenobarbital Urinprod. µl/h/100gKG	Phenobarbital ^{14}C-Aktivität % Dosis/h
1	507	0,70	175	0,20	989	2,39
2	251	0,20	165	0,30	332	0,41
3	349	0,60	133	0,16	673	0,93
4	339	0,14	403	0,57	394	0,67
5	1438	2,77	605	0,99		
6	926	1,18	345	0,28		
	635	0,93	304	0,42	597	1,10
	± 461	± 0,98	± 183	± 0,32	± 300	± 0,89
			$p < 0,05$	$p < 0,10$	n.s.	n.s.

Tab. 9 Urinproduktion und Ausscheidung von HB und HB-Metaboliten in den Urin berechnet nach der ausgeschiedenen ^{14}C-Aktivität bei Versuchstieren mit Galaktosamin-Hepatitis und Phenobarbitalvorbehandlung nach Applikation von 100 mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB im Vergleich zum Kontrollkollektiv.
Signifikanzen wurden im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet.

Tier Nr.	Kontrollen % polarer Metabolit	Kontrollen % unpolarer Metabolit	Galaktosamin-Hepatitis % polarer Metabolit	Galaktosamin-Hepatitis % unpolarer Metabolit	Phenobarbital % polarer Metabolit	Phenobarbital % unpolarer Metabolit
1	80,2	18,8	27,9	72,1	83,8	16,2
2	74,0	26,0	50,6	49,4	83,8	16,2
3	90,8	9,2	30,1	69,9	66,9	33,1
4	87,3	12,7	56,1	43,9	93,9	6,1
5	75,7	24,3	68,7	31,3		
6	87,2	12,8	42,9	57,1		
	82,5	17,5	46,1	53,9	81,9	18,1
	± 6,9		± 15,7		± 11,2	± 11,2
			$p < 0,0005$		n.s.	n.s.

Tab. 10 Prozentuales Verhältnis polarer und unpolarer HB-Metaboliten in der Galle nach Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und nach Phenobarbitalvorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv nach Applikation von 100 mg/kg HB und 5 µCi ^{14}C-HB.
Signifikanzen wurden im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet.

Tier Nr.	Kontrollen % polarer Metabolit	Kontrollen % unpolarer Metabolit	Galaktosamin-Hepatitis % polarer Metabolit	Galaktosamin-Hepatitis % unpolarer Metabolit	Phenobarbital % polarer Metabolit	Phenobarbital % unpolarer Metabolit
1	8,1	91,9	18,0	82,0	10,9	89,1
2	12,4	87,6	13,2	86,8	10,7	89,3
3	10,5	89,5	36,6	63,4	3,3	96,7
4	8,5	91,8	18,8	81,2	11,5	88,5
5	2,6	97,4	29,7	70,3		
6	4,4	95,6	20,2	79,8		
	7,7	92,3	22,8	77,2	9,1	90,9
	± 3,7	± 3,7	± 8,7		± 3,9	± 3,9
			$p < 0,005$		n.s.	n.s.

Tab. 11 Prozentuales Verhältnis polarer und unpolarer HB-Metaboliten im Urin nach Auftrennung durch Dünnschichtchromatographie bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und nach Phenobarbitalvorbehandlung im Vergleich zum Kontrollkollektiv nach Applikation von 100 mg/kg HB und 5 µCi ^{14}C-HB.
Signifikanzen wurden im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet.

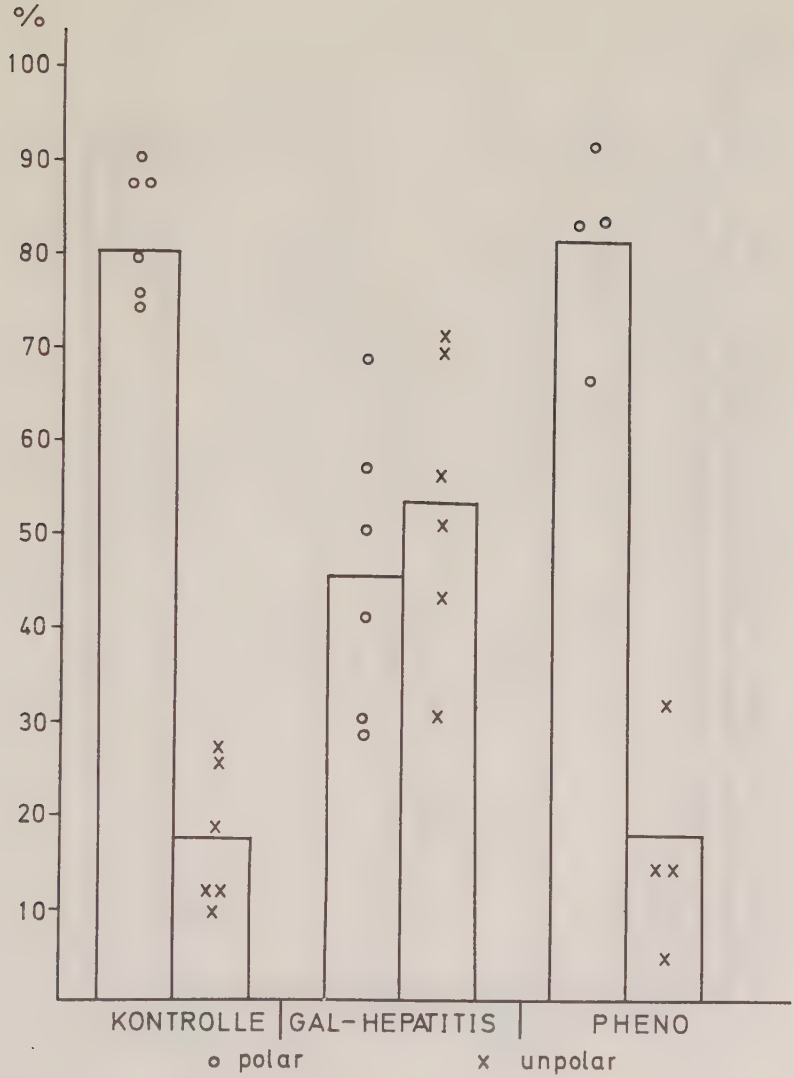

Abb. 7 Prozentuales Verhältnis der polaren und unpolaren HB-Metaboliten in der Galle bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und Phenobarbitalvorbehandlung im Vergleich zu Tieren des Kontrollkollektivs nach Applikation von 100 mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB.

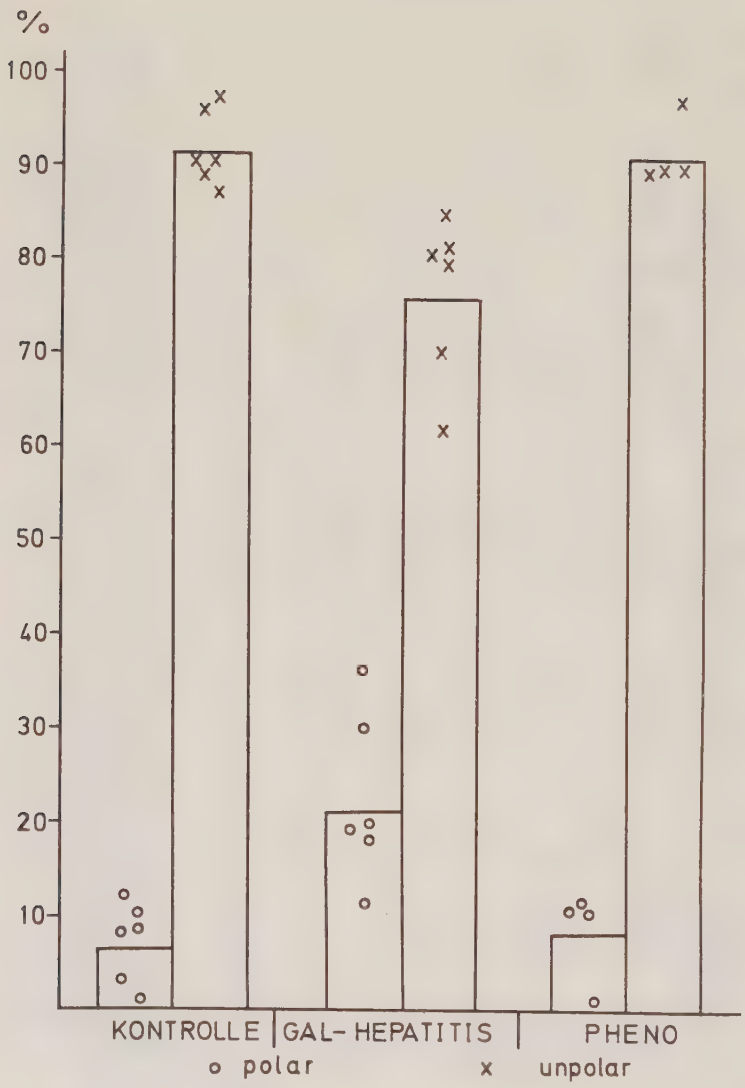

Abb. 8 Prozentuales Verhältnis polarer und unpolarer HB-Metaboliten im Urin bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und Phenobarbitalvorbehandlung im Vergleich zu Tieren des Kontrollkollektivs nach Applikation von 100 mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB.

Tier Nr.	Kontrollen		Galaktosamin-Hepatitis		Phenobarbital	
	polar µg/h/100 g KG	unpolar	polar µg/h/100 g KG	unpolar	polar µg/h/100 g KG	unpolar
1	258	61	2,8	7,2	286	55
2	246	87	10,3	13,7	149	30
3	908	92	12,9	10,1	44	47
4	184	27	43,3	19,7	153	10
5	185	59	44,5	43,5		
6	333	49	9,9	23,1		
	352,3	62,5	20,6	19,6	158	36
	± 277,7	± 24,2	± 18,3	± 13,1	± 99	± 20
			$p < 0,01$	$p < 0,0025$	$p < 0,05$	$p < 0,05$

Tab. 12 Ausscheidung von polaren und unpolaren HB-Metaboliten in die Galle bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und Phenobarbitalvorbehandlung im Vergleich zu Tieren des Kontrollkollektivs, nach Applikation von 100 mg/kg HB und 5 µCi ^{14}C-HB. Signifikanzen im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet.

Tier Nr.	Kontrollen polar µg/h/100 g KG	Kontrollen unpolar µg/h/100 g KG	Galaktosamin-Hepatitis polar µg/h/100 g KG	Galaktosamin-Hepatitis unpolar µg/h/100 g KG	Phenobarbital polar µg/h/100 g KG	Phenobarbital unpolar µg/h/100 g KG
1	5,7	64	3,6	16,4	26,0	213
2	2,5	18	5,7	22,3	4,4	37
3	6,3	54	10,7	46,3	3,1	90
4	1,1	13	5,9	10,1	7,7	59
5	7,2	270	4,0	26,0		
6	5,2	113	5,9	10,1		
	4,7	88,7	6,0	21,9	10,3	99,8
	± 2,4	± 95,9	± 2,5	± 13,5	± 10,6	± 78,6
			n.s.	$p < 0,1$	n.s.	n.s.

Tab. 13 Ausscheidung von polaren und unpolaren HB-Metaboliten in den Urin bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und Phenobarbitalvorbehandlung im Vergleich zu Tieren des Kontrollkollektivs, nach Applikation von 100 mg/kg HB und 5 µCi ^{14}C-HB. Signifikanzen wurden im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet.

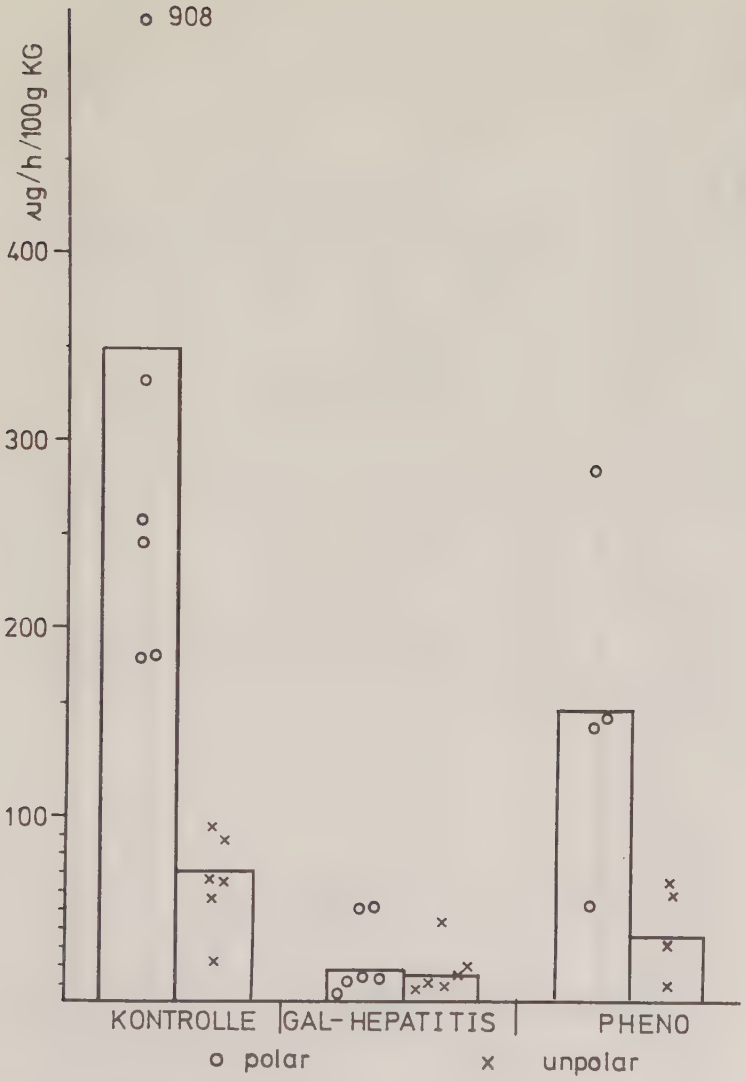

Abb. 9 Ausscheidung von polaren und unpolaren HB-Metaboliten in die Galle bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und Phenobarbitalvorbehandlung im Vergleich zu Tieren des Kontrollkollektivs nach Applikation von 100 mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB.

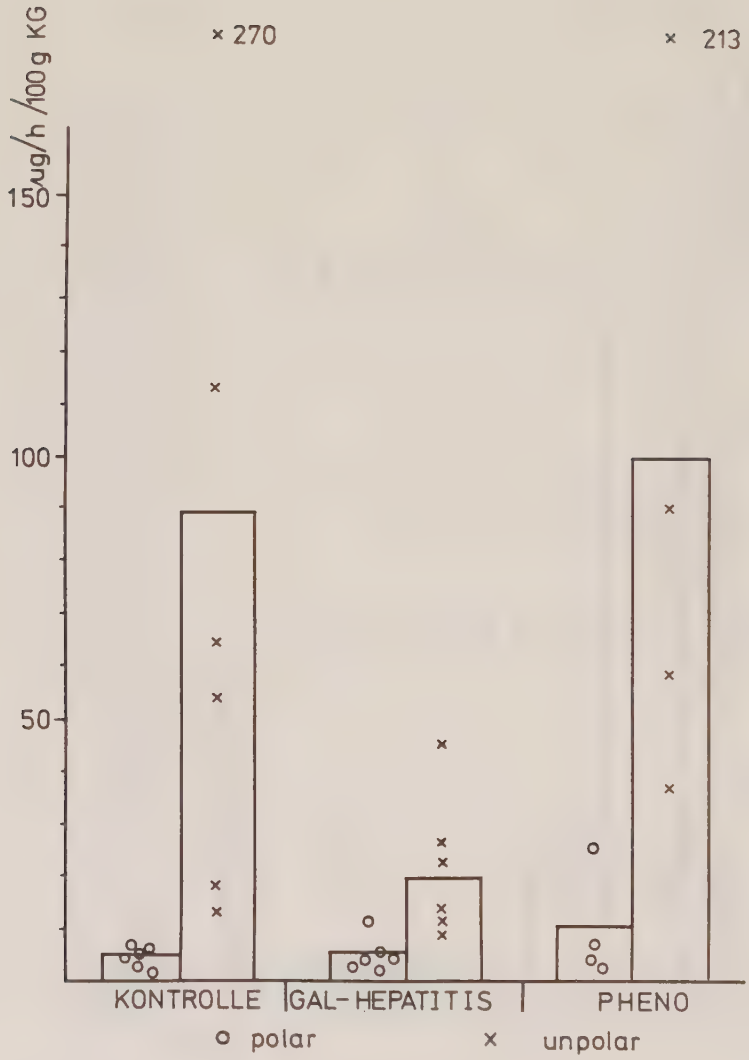

Abb. 10 Ausscheidung von polaren und unpolaren HB-Metaboliten in den Urin bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und Phenobarbitalvorbehandlung im Vergleich zu Tieren des Kontrollkollektivs, nach Applikation von 100 mg/kg KG HB und 5 µCi ^{14}C-HB.

Tier Nr.	Kontrollen			Galaktosamin-Hepatitis			Phenobarbital		
	Gesamtausscheidung	Metabolit polar	unpolar	Gesamtausscheidung	Metabolit polar	unpolar	Gesamtausscheidung	Metabolit polar	unpolar
	% Dosis/h	µg/h/100 g KG		% Dosis/h	µg/h/100 g KG		% Dosis/h	µg/h/100 g KG	
1	3,92	264	125	0,30	6,4	23,6	6,80	312	268
2	3,53	249	105	0,54	16,0	36,0	2,20	153	64
3	10,60	914	146	0,39	23,6	56,4	2,34	47	137
4	2,25	185	40	1,20	49,2	29,8	2,30	161	69
5	5,21	192	329	1,87	48,5	69,5			
6	5,00	338	162	0,61	15,8	33,2			
	5,09	357	151	0,82	26,6	41,4	3,16	168	135
	± 2,91	± 228	± 97	± 0,60	± 18,3	±12,7	± 1,76	± 109	± 94
				$p < 0,005$	$p < 0,01$	$p < 0,0125$	n.s.	n.s.	n.s.

Tab. 14 Gesamtausscheidung von HB-Metaboliten und Anteil von polaren und unpolaren Metaboliten an der Gesamtausscheidung bei Kontrolltieren, Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis und Phenobarbitalvorbehandlung nach Applikation von 100 mg/kg HB und 5 µCi ^{14}C HB.
Signifikanzen im Vergleich zum Kontrollkollektiv berechnet.

VII. DISKUSSION

Eine kurze Zusammenfassung der wesentlichen Ergebnisse soll der Diskussion vorangestellt werden.

1. Etwa 16 - 18 Stunden nach intraperitonealer Injektion von 500 mg/kg KG Galaktosamin zeigt diese Versuchsgruppe eine leichte, der menschlichen Virushepatitis ähnliche Lebererkrankung. Die Galleproduktion erniedrigt sich auf etwa die Hälfte, die GCH im Serum ist deutlich erhöht, die GCHDCH, die bei gesunden Tieren nicht nachweisbar ist, erscheint bei Galaktosamintieren in geringer Konzentration im Serum. Als Leitenzym der Galaktosamin-Hepatitis ist die GPT deutlich erhöht. Eine Verminderung des Galleflusses korreliert eindeutig mit einer Erhöhung der GPT (Abb. 11).

2. Galaktosamintiere scheiden über den Zeitraum einer Stunde erheblich weniger ^{14}C-HB-Metabolite aus, als die Tiere der Kontrollgruppen. In der Galle scheiden Galaktosamintiere nur etwa 1/10 der applizierten Dosis aus im Vergleich zu Kontrolltieren (4,15 %), während im Urin der Galaktosamintiere etwa die Hälfte (0,42 %) der eingesetzten Dosis erscheint (Kontrolltiere ca. 1 %).

3. In der Galle von Kontrolltieren sind 82,5 % polare Metabolite, während sich diese in der Galle von Galaktosamintieren auf etwas weniger als die Hälfte verringert. Im Urin der Galaktosamintiere erscheinen etwa 23 % als polare HB-Metabolite, während die Kontrollgruppe nur rund 8 % polarer Metaboliten aufweisen.

4. Pheno-Tiere zeigen ein ähnliches Verteilungsmuster polarer und unpolarer HB-Metabolite in Galle und Urin wie Tiere der Kontrollgruppe. Lediglich die absolute Ausscheidung von HB-Metaboliten ist bei diesen Tieren um die Hälfte reduziert.

Der Ausscheidung von HB-Metaboliten in den Urin ist aufgrund ihrer leichten Zugänglichkeit bisher größere Aufmerksamkeit geschenkt worden, als den Transport- und Metabolisierungsvorgängen, die zu ihrer renalen Exkretion führen.

Bisherige Untersuchungen zeigen, daß 95 % einer Dosis von HB im Urin wiedergefunden werden. Nur 4 % werden mit den Faeces ausgeschieden. Die Metabolite verteilen sich im Urin zu 19 % der Dosis auf 3'-Hydroxy-HB, 59 % der Dosis 3'-Keto-HB, 10 % der Dosis 1,5-Dimethylbarbitursäure und jeweils weniger als 1 % der Dosis als HB, nor-HB und 1', 2'-Epoxid-HB. Dieser Gruppe von vergleichsweise unpolaren Substanzen, die ca. 90 % der Metabolite im Urin darstellt, steht nur ein geringer Anteil von polarem Material mit etwa 5 % gegenüber (14,43). Mit diesen bekannten Tatsachen stehen die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse in guter Übereinstimmung. Das von uns gefundene Verhältnis polarer zu unpolaren Metaboliten im Urin beträgt im Mittel 7,7 % zu 92,3 %.

HOLCOMB u. Mitarb. (14) beschreiben in der Galle das überwiegende Auftreten von polaren Metaboliten, ohne nähere quantitative oder qualitative Charakterisierung. Es finden sich jedoch Angaben über das Verhalten dieser Metaboliten, die wohl identisch sind mit den von uns gefundenen polaren Substanzen: a) Sie erscheinen nur in unwesentlicher Menge im Urin. b) Bei der Inkubation von Leberhomogenat mit HB finden sich nur Spuren polarer Substanz.
c) Versuche mit isoliert perfundierten Lebern zeigten, daß die polaren Metabolite in relativ bescheidenem Umfang im Lebergewebe, in viel geringerer Menge im Perfusat und als überwiegende Fraktion in der Galle gefunden werden können.

Ist infolge einer Galaktosamin-Hepatitis oder einer Cholestase die Ausscheidung der HB-Metaboliten in die Galle nicht möglich, so erscheinen sie vermehrt im Urin. Dieser Befund stimmt mit Ergebnissen von HEYNEN und JOERES überein (12,13,17).

Die polaren HB-Metaboliten haben somit folgende Eigenschaften:

1. Sie werden in der intakten Leber gebildet und beim gesunden Tier fast ausschließlich in die Galle ausgeschieden.

2. Sie sind wesentlich polarer als bisher bekannte HB-Metabolite.

3. Sie durchlaufen einen enterohepatischen Kreislauf und werden zu unpolaren Metaboliten umgewandelt im Urin ausgeschieden.

4. Sie erscheinen bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis in erhöhtem Maße im Urin.

Im folgenden soll versucht werden, aus diesen Eigenschaften Hinweise auf eine mögliche stoffliche Zusammensetzung zu erhalten.

Nach MILLBURN (24) ist das Molekulargewicht eine empirische Bestimmungsgröße für den Grad der Ausscheidung einer Substanz in die Galle. Dabei steht das Molekulargewicht in enger Beziehung zur Lipophilie einer Substanz. Darüberhinaus ist das Vorhandensein von polaren Gruppen Grundlage der Gallengängigkeit. Innerhalb eines Molekulargewichtsbereiches von ca. 300 bis über 400 werden Substanzen sowohl in Galle als auch Urin ausgeschieden, wobei bei Verlegung des einen Weges der andere kompensatorisch beschritten wird. Unterhalb dieses Bereiches erfolgt die Ausscheidung praktisch nur über die Nieren, bei Molekulargewichten über ca. 500 werden Substanzen fast nur mit der Galle sezerniert. In diesen Fällen ist eine kompensatorische Ausscheidung über den jeweils alternativen Weg höchstens in ungenügendem Umfang möglich.

Alle in dieser Arbeit als unpolar bezeichneten HB-Metabolite liegen mit ihrem Molekulargewicht unterhalb des Grenzwertes von 300. Dementsprechend werden sie auch bevorzugt in den Urin ausgeschieden. Die polaren Metabolite sind stark cholephil und werden bei Cholestase nur unvollständig renal eliminiert. Ob es

sich hierbei um einen Einfluß des Molekulargewichtes oder der Leberschädigung handelt, kann nicht entschieden werden. Es liegt jedoch nahe anzunehmen, daß die polaren HB-Metabolite ein höheres Molekulargewicht haben als die Ausgangssubstanz Hexobarbital.

Eine solche Anhebung des Molekulargewichtes wird durch die Bildung von Konjugaten ermöglicht, wobei Glucuronsäure, Sulfat und Aminosäuren wie Glutathion häufige Partner sind. Ausgehend von den primären Stoffwechselprodukten des HB 3'-Hydroxy-HB und 1', 2'-Epoxid-HB sind Konjugationsreaktionen grundsätzlich denkbar. TOKI und TAKENOUCHI (40) isolierten aus Kaninchenurin das von 3'-OH-HB abgeleitete Glucuronid. Denkbar wäre auch die Bildung eines Sulfatkonjugates von 3'-OH-HB. 1', 2'-Epoxid-HB scheint geeignet, eine Verbindung mit Glutathion einzugehen.

Unsere methodischen Untersuchungen erbrachten über diesen Punkt keine Klarheit. Es gelang nicht, die polare Metabolitfraktion durch ^{14}C-Glucose oder ^{35}S-Sulfat zu markieren. Ebenso war ß-Glucuronidase nicht in der Lage, die polaren Metabolite spezifisch zu verändern. Erwartungsgemäß wurde durch Säurehydrolyse ein Teil der polaren Fraktion quantitativ in unpolare Metabolite umgewandelt (13,43). Bemerkenswert ist jedoch, daß die sehr milde Behandlung mit 50 % Äthanol bei 40°C über 1 Std. in der Lage war, die polaren Metabolite zu 50 % in einen unpolaren Metaboliten mit einem Rf-Wert wie 3'-Keto-HB zu überführen. Sicherlich kann dieser Befund kein Beweis gegen die Konjugatnatur der polaren Metabolite sein, doch läßt er immerhin daran denken, daß es sich möglicherweise um ein lockeres Assoziationsprodukt an andere Bestandteile der Galle handeln könnte.

VONK et al. (44) und SCHARSCHMID und SCHMID (33) zeigten, daß Substanzen wie Bromsulphthalein, Indocyaningrün und konjugiertes Bilirubin in einer im Vergleich zum Serum hohen Konzentration in die Galle ausgeschieden werden. Dies wird ermöglicht durch eine Bindung dieser Stoffe an Gallensäuremicellen. Grundsätzlich kann

man diese Möglichkeit auch für HB-Metabolite in Erwägung ziehen.

Aus der Tatsache, daß polare Metabolite im intakten Tier praktisch nicht ausgeschieden werden (2,13,14,43) während sie das Hauptstoffwechselprodukt sind, das die Leber verläßt, folgt, daß sie einen enterohepatischen Kreislauf durchmachen und hierbei in unpolare Metabolite, d.h. überwiegend 3'-Keto-HB, umgewandelt werden. El HAWARI und PLAA (5) zeigten die Bedeutung des enterohepatischen Kreislaufs für Phenytoinkonjugate mit Glucuronsäure. Vor der enteralen Rückresorption werden diese Konjugate wohl vornehmlich durch die ß-Glucuronidase enthaltende Darmflora gespalten, um dann wieder, zumindest teilweise konjugiert in der Galle zu erscheinen. Ähnliches Verhalten zeigten die polaren HB-Metaboliten in unseren Versuchen. Führt man einem intakten Tier oral ^{14}C-HB-Metabolite enthaltende Galle zu, so findet man ca. 90 % der Aktivität im Urin wieder. Zerstört man durch Neomycin die natürliche Darmflora, werden nur noch ca. 70 % renal eliminiert. Die Bakterienflora scheint auch hier von Bedeutung für das Funktionieren des enterohepatischen Kreislaufs zu sein. Bei dem hohen Anteil des polaren Metaboliten in der Galle beeinflußt der enterohepatische Kreislauf wohl auch entscheidend die biologische Halbwertszeit des Hexobarbital.

Die Phenobarbitalvorbehandlung führte nicht zu der erwarteten Steigerung der HB-Metabolisierung (3,32,39,46). Die Ausscheidung sowohl der polaren als auch der unpolaren Metaboliten in die Galle war um ca. 50 % vermindert. Nachdem darüberhinaus keine bedeutenden Unterschiede gegenüber der Kontrollgruppe festzustellen sind, fällt eine Erklärung dieses Befundes schwer. Während GLAZER und SARTORELLI (6) zeigen konnten, daß nach Phenobarbitalgabe in der Leber vermehrt Protein gebildet wird, wiesen TUMA u. Mitarb. (41) nach, daß Phenobarbital dosisabhängig die Sekretion von Glykoproteinen durch die Leber vermindert. Wenn daraus auch keine Interpretation der Ergebnisse folgen kann, darf man doch wohl feststellen, daß Phenobarbital nicht in jeder Hinsicht den Stoff-

wechsel der Leber stimulierend beeinflußt.

Im Gegensatz zur ANIT-Cholestase, die nach bisherigen Erkenntnissen wohl keine hepatozellulären Veränderungen hervorruft, sondern eher Transportvorgänge selektiv beeinflußt, scheint die Galaktosamin-Hepatitis tiefergreifende Veränderungen im Leberparenchym zu bewirken. Als biochemische Antwort auf die Galaktosamingabe nehmen LIEHR u. Mitarb. (20) Defekte an den Membranen der Mitochondrien und Leberzellen an. Für eine Schädigung des gesamten Zellgefüges spricht auch die verminderte Synthese von Gerinnungsfaktoren, die Einschränkung der Galaktoseelimination, sowie eine herabgesetzte HB-Clearance (9,31).

Trotz des relativ kurzen Versuchszeitraumes zeigt sich, daß offensichtlich die HB-Metabolit-Ausscheidung als ein weiterer Parameter der Leberzellfunktion in Abhängigkeit vom Gallefluß erfolgt (Tab. 8, Abb. 11), so daß bei einer Verminderung des Galleflußes auf etwa 50 % der vergleichbaren Kontrollgruppe die Metabolitausscheidung auf etwa 10 % der Norm zurückgeht. Hierbei sind sowohl die polaren als auch die unpolaren Fraktionen zur Hälfte beteiligt, was zu einem Rückgang polarer HB-Metabolite auf ca. 7 % und unpolarer HB-Metabolite auf etwa ein Drittel der Kontrollgruppe führt. Eine Verknüpfung von Gallefluß und HB-Metabolitausscheidung ist bei Tieren der Kontrollgruppe und bei Pheno-Tieren nicht nachweisbar.

Es können in diesem Zusammenhang nur Vermutungen darüber angestellt werden, inwieweit eine Zunahme der Schwere der Galaktosamin-Erkrankung den Gallefluß und damit die Metabolit-Ausscheidung beeinträchtigt. HEYNEN (12) fand bei Tieren mit schwerer Galaktosamin-Hepatitis eine starke Verminderung der Ausscheidung unpolarer Metabolite in den Urin, so daß die bisherigen Ergebnisse die Annahme rechtfertigen, daß eine eindeutige Verbindung zwischen Gallefluß und der Ausscheidung beider Metabolitfraktionen besteht.

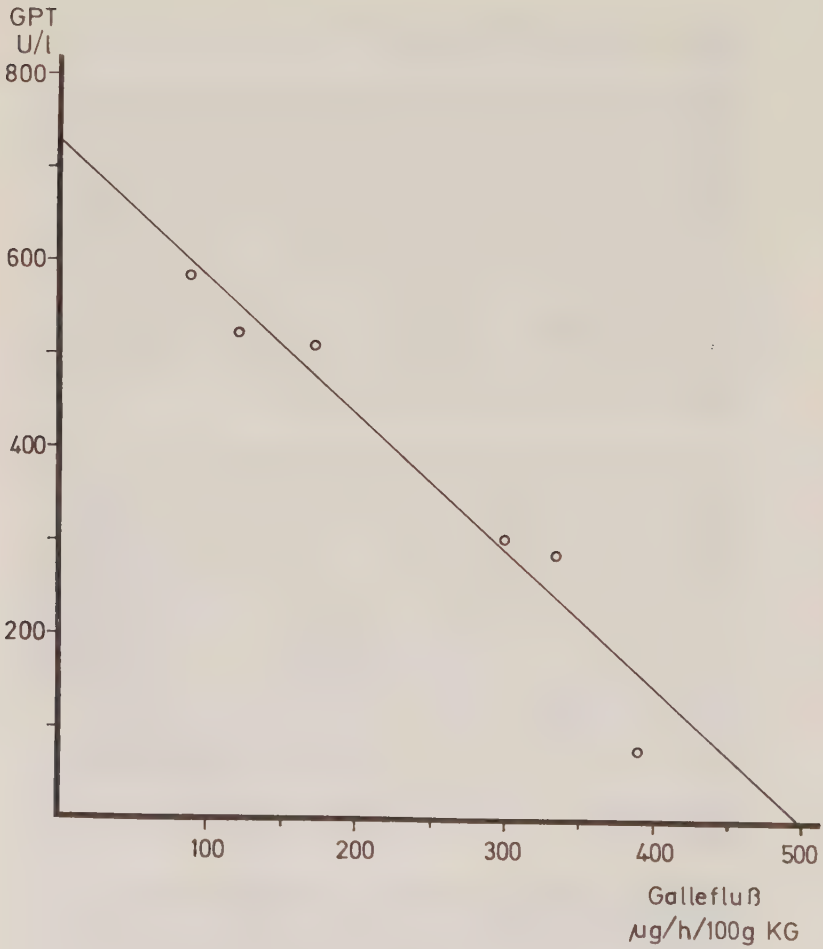

Abb. 11 Beziehung zwischen Gallefluß und Anstieg der Glutamat-Pyruvat-Transaminase im Serum von Tieren mit beginnender Galaktosamin-Hepatitis.

Dieser Mangel an Metabolitausscheidung könnte auf eine Leberzellstörung schließen lassen, die die Gallebildung beeinflußt.

Die Ausscheidung von polaren Metaboliten in den Urin bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis eröht sich in gleichem Maße, wie die Ausscheidung unpolarer Metabolite abnimmt (Tab. 11). Ähnliche Verhältnisse, jedoch mit wesentlich stärkerem Anstieg der polaren Metaboliten-Fraktionen werden bei der Cholestase nachgewiesen (13,17).

Die Frage, ob die vermehrte Ausscheidung polarer Metabolite in den Urin bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis einen physiologischen Kompensationsmechanismus darstellt, oder ob es sich möglicherweise um eine Schädigung der Niere und damit einer Beeinträchtigung ihrer Funktion handelt, kann nicht sicher beantwortet werden. GRON u. Mitarb. (9) fanden jedoch ein Ödem des Nierenin terstitiums bei Tieren mit Galaktosamin-Hepatitis, was die Vermutung nahelegt, daß durch Leberinsuffizienz und eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion ein Nierenversagen hervorgerufen wird durch Stoffwechselprodukte, auf deren Ausscheidung sie normalerweise nicht eingerichtet ist.

Die von uns durchgeführten Versuche sind nicht dazu geeignet, die hier angeführten Erklärungen zu belegen. Die Ergebnisse lassen jedoch erkennen, daß das Eliminationssystem der Leber schon auf geringe Störungen empfindlich reagiert, die mit normalen klinischen Parametern schwer nachweisbar sind.

VIII. ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit sollte der Einfluß der Galaktosamin-Hepatitis auf die Ausscheidung von ^{14}C-HB-Metaboliten in Galle und Urin bei Ratten untersucht werden.

Als Kontrollgruppen dienten unbehandelte und phenobarbitalvorbehandelte Tiere.

Die Tiere der Kontrollgruppen scheiden in der Galle polare und unpolare HB-Metaboliten im Verhältnis 1:4 aus. Im Urin finden sich im wesentlichen nur unpolare Metaboliten.

Bei sechs Ratten ist der Gallefluß 16 - 18 Stunden nach i.p. Applikation von 500 mg/kg KG Galaktosamin auf ca. die Hälfte und die HB-Metabolit-Ausscheidung in die Galle auf 1/10 reduziert. Diese Verminderung geht hauptsächlich zu Lasten der unpolaren Metabolitfraktion.

Die polaren Metabolite können durch Säurehydrolyse und Behandlung mit 50 % Äthanol zum Teil in Substanzen mit den dünnschichtchromatographischen Eigenschaften von 3'-Keto-HB überführt werden.

Die durch Galaktosamin hervorgerufene Schädigung beeinträchtigt möglicherweise sowohl das arzneimittelabbauende Enzymsystem als auch das Transportsystem in der Leberzelle.

IX LITERATURVERZEICHNIS

1. ADACHI, Y., YAMAMOTO, T.:
Influence of drugs and chemicals upon hepatic enzymes and proteins. I. Structure-activity relationship between various barbiturates and microsomal enzyme induction in rat liver.
Biochem. Pharmacol. 25,663-668 (1976)

2. BUSH, M.T., WELLER, W.:
Metabolic fate of hexobarbital (HB)
Drug Metab. Reviews 1, 249-290 (1972)

3. CHRISTENSEN, F.:
Metabolism of dicumarol by liver microsomes from untreated and phenobarbital-treated rats.
Biochem. Pharmacol. 21, 2303-2311 (1972)

4. DECKER, K., KEPPLER, D., RUDIGIER, J., DOMSCHKE, W.:
Cell damage by trapping of biosynthetic intermediates: The role of uracil nucleotides in experimental hepatitis.
Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 352/I, 412-418 (1971)

5. EL-HAWARI, A.M., PLAA, G.L.:
Role of enterohepatic circulation in the elimination of phenytoin in the rat.
Drug. Met. Dispos. 6, 59-70 (1978)

6. GLAZER, R.J., SARTORELLI, A.C.:
The effect of phenobarbital on the synthesis of nascent protein in free and membrane-bound polyribosomes of normal and regenerating liver.
Mol. Pharm. 8, 701-710 (1972)

7. GREIM, H., SCHENKMANN, J.B., KLOTZBÜCHER, M., REMMER, H.:
The influence of phenobarbital on the turnover of hepatic microsomal cytochrom b_5 and cytochrome P-450 hemes in the rat.
Biochem. Biophys. Acta 201, 20-25 (1970)

8. GREIM, H., TRÖLZSCH, D., ROBOZ, J., DRESSLER, K., CZYGAN, P., HUTTERER, F., SCHAFFNER, F., POPPER, H.:
Mechanism of cholestasis, 5. Bile acids in normal rat livers and in those after bile duct ligation.
Gastroenterol. 63, 837-845 (1972)

9. GRÖN, M., BRUNSWIG, D., MERSCH-BAUMERT, K., CONRADT, M., HÖRDER, M.H., LAUM, A., LIEHR, H., KRAUSS, H., RICHTER, E.:
Gerinnungsstörungen bei der "Galaktosamin-Hepatitis" der Ratte.
Acta Hepato-Gastroenterol. 19, 103-108 (1972)

10. GRÖN, M., LIEHR, H., RASENACK, U.:
Die Bedeutung intestinaler Endotoxine für die Entstehung des toxischen Leberschadens nach Galaktosamin.
82. Tag. Dtsch. Ges. Inn. Med. 301 (1976)

11. HABIG, W.H., PABST, M.J., FLEISCHNER, G., GATMAITAN, Z., ARIAS, I.M., JAKOBY, W.B.:
The identity of Glutathione S-Transferase B with Ligandin, a major binding protein of liver.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71, 3879-3882 (1974)

12. HEYNEN, G.:
Metabolit-Ausscheidung im Harn nach oraler Gabe von ^{3}H-Hexobarbital und ^{3}H-Paracetamol bei Ratten mit Galaktosamin-Hepatitis.
Inaug. Diss. Würzburg (1978)

13. HEYNEN, H.U.:
Metabolit-Ausscheidung im Harn nach oraler Gabe von ^{3}H-Hexobarbital und ^{3}H-Paracetamol bei Ratten mit ANIT-Cholestase.
Inaug. Diss.Würzburg (1978)

14. HOLCOMB, R., GERBER, N., BUSH, M.:
The metabolic fate of hexobarbital in the rat.
J. Pharmacol. Exp. Therap. 188, 15-26 (1974)

15. HUTTERER, F., DENK, H., BACCHIN, P.G., SCHENKMAN, J.B., SCHAFFNER, F., POPPER, H.:
Mechanism of cholestasis. I. Effect of bile acids on microsomal cytochrome P-450 dependent on biotransformation system in vitro.
Life Sciences 9, 877-887 (1970)

16. IGA, T., SUGIYAMA, Y., YOKOTA, M., TOMONO, Y., AWAZU, S., HANANO, M.:
Pharmacokinetic aspects of sulfobromophtalein transport in chronically carbon tetrachloride intoxicated rats.
Biochem. Pharmacol. 26, 1867-1875 (1977)

17. JOERES, R.P.:
Ausscheidung von ^{14}C-Hexobarbital-Metaboliten in Galle und Urin bei Versuchstieren mit beginnender ANIT-Cholestase.
Inaugural-Dissertation, Würzburg

18. KAKIS, G., YOUSEF, I.M.:
Pathogenesis of lithocholate- and taurolitocholate-induced intrahepatic cholestasis in rats.
Gastroenterol. 75, 595-607 (1978)

19. KOFF, R.S., GORDON, G., SABESIN, S.M.:
D-Galactosamin hepatitis - hepatocellular injury and fatty liver following a single dose.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 137, 696-701 (1971)

20. LIEHR, H., GRÖN, M., SEELIG, H.P., SEELIG, R., REUTTER, W., HEINE, W.D.:
On the pathogenesis of galactosamin hepatitis.
Virchows Arch. B Cell Path. 26, 331-344 (1978)

21. MACKINNON, A.M., SUTHERLAND, E., SIMON, F.R.:
Qualitativ alteration in hepatic microsomal cytochrom P-450 apoproteins associated with bile duct ligation and the administration of ethinyl estradiol, phenobarbital and 3-methylcholanthrene.
Bioch. Pharmacol. 27, 29-35 (1978)

22. MARTIN, J.F., VIERLING, J.M., WOLKOFF, A.W., SCHARSCHMIDT, B.F., VERGALLA, J., WAGGONER, J.G., BERK, P.D.:
Abnormal hepatic transport of indocyanine green in Gilbert's syndrome.
Gastroenterol. 70, 385-391 (1976)

23. MEDLINE, A., SCHAFFNER, F., POPPER, H.:
Ultrastructural features in galactosamine-induced hepatitis.
Exp. Mol. Pathol. 12, 201-211 (1970)

24. MILLBURN, P.:
Excretion of xenobiotic compounds in bile. In: The hepatobiliary system. Fundamental and pathological mechanism.
(Ed. W. Taylor) pp. 109, New York Plenum Press (1976)

25. PAUMGARTNER, G.:
The handling of indocyanine green by the liver.
Schweiz. Med. Wschr. Suppl. (1975)

26. REINKE, L.A., O'CONNOR, M.F., PIEPHO, R.W., STOHS, S.J.:
A comparison of the inductive effects of phenobarbital, methaqualone and methyprylone on hepatic mixed function oxidase enzymes in the rat.
Res. comm. chem. path. pharmacol. II, 45-53 (1975)

27. REUTTER, W., BAUER, C., BACHMANN, W., LESCH, R.:
Über die primäre und sekundäre biochemische Antwort der Leber nach Gabe von D-Galaktosamin beim Zustandekommen der Galaktosamin-Hepatitis.
Verh. dtsch. Ges. Inn. Med. 79, 927-930 (1973)

28. REUTTER, W., LESCH, R., KEPPLER, D., DECKER, K.:
Galaktosamin-Hepatitis.
Naturwiss. 55, 497 (1968)

29. REYES, H.R., LEVI, A.J., GATMAITAN, Z., ARIAS, I.M.:
Studies of Y and Z, two hepatic cytoplasmic organic anion-binding proteins: effect of drugs, chemicals, hormones and cholestasis.
J. Clin. Invest. 50, 2242-2252 (1971)

30. RICHTER, E., GRON, M., KOHN, H.A.:
Proteinsynthese und Ikterus bei der ANIT-Cholestase der Ratte.
Verh. dtsch. Ges. Inn. Med. 15, 367-369 (1969)

31. RICHTER, E.:
Unveröffentlichte Ergebnisse

32. ROERIG, D., HASEGAWA, A.T., WANG, R.I.:
Effect of phenobarbital pretreatment on the metabolism and biliary excretion of methadone.
Biochem. Pharmacol. 24, 355-362 (1975)

33. SCHARSCHMIDT, B.F., SCHMID, R.:
The micellar sink. A quantiative assessment of the association of organic anions with mixed micelles and other macromolecular aggregates in rat bile.
J. Clin. Invest. 62, 1122-1131 (1978)

34. SCHARSCHMIDT, B.F., WAGGONER, J.G., BERK, P.D.:
Hepatic organic anion uptake in the rat.
J. Clin. Invest. 56, 1280-1292 (1975)

35. SCHWENK, M., BURR, R., SCHWARZ, L., PFAFF, E.:
Uptake of Bromosulfophtalein by isolated liver cells.
Eur. J. Biochem. 64, 189-197 (1976)

36. SHINOZUKA, H.:
Ultrastructural study of liver cell injury due to UTP deficiency.
Virchow's Arch. B. Cell Path. 15, 119-130 (1974)

37. SIMON, F.R., SUTHERLAND, E., ACCATINO, L.:
Stimulation of hepatic sodium and potassium activated adenosine triphosphatase activity by phenobarbital.
J. Clin. Invest. 59, 849-861 (1977)

38. SMALL, D.M., DOWLING, R.H., REDINGER, R.N.:
The enterohepatic circulation of bile salts.
Arch. intern. Med. 130, 552-573 (1972)

39. STRAMENTINOLI, G., GAZZANIGA, A., DELLABELLA D., REMMER, H.:
Increase of chloramphenicol glucuronidation in rats treated with phenobarbital.
Biochem. Pharmacol. 23, 1181-1186 (1974)

40. TOKI, S., TAKENOUCH, T.:
Hexobarbital metabolism. Formation of α-1.5-dimethyl-5-(3-hydroxy-I-cyclohexen-I-yl)-barbituric acid glucoronide.
Chem. Pharm. Bull. 13, 606-609 (1965)

41. TUMA, D.J., JENNETT, R.B., SORREL, M.F.:
Impairment of glycoprotein secretion by phenobarbital in rat liver slices.
Biochem. biophys. Acta 544, 144-152 (1978)

42. VAN BERGE HENEGOUWEN G.P.:
Bile acids and cholestasis.
Thesis (1974) Nijmwegen, The Netherlands

43. VERMEULEN, N.P.E., BAKKER, B.H., SCHULTINK, J., VAN DER GEN, A., BREIMER, D.D.:
The epoxide-diol pathway in the metabolism of hexobarbital in rats and man.
Xenobiotica (in press 1979)

44. VONK, R.J., JEKEL, P., MEIJER, D.K.F.:
Choleresis and hepatic transport mechanisms. II. Influence of bile salt choleresis and biliary micelle binding on biliary excretion of various organic anions.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 290, 375-387 (1975)

45. VONK, R.J., JEKEL, P.A., MEIJER, D.K.F., HARDONK, M.J.:
Transport of drugs in isolated hepatocytes. The influence of bile salts.
Biochem. Pharmacol. 27, 397-405 (1978)

46. WHEELAN, G., COMBES, B.:
Phenobarbital enhanced biliary excretion of administered unconjugated and conjugated sulfobromophthalein (BSP) in the rat.
Biochem. Pharmacol. 24, 1283-1286 (1975)

Herrn Prof. Dr. med. E. Richter danke ich für die Überlassung des Themas und für die Unterstützung bei der Interpretation der Ergebnisse.

Herrn Prof. Dr. med. K. Kochsiek danke ich für die Übernahme des Korreferates.

Herrn Dr. med. R. P. Joeres gilt mein besonderer Dank für die freundschaftliche Zusammenarbeit.

LEBENSLAUF

geboren	07.06.1941 in Essen
Eltern	Franz Buschmann, gef. 1944 Elisabeth Strätling, verw. Buschmann, geb. Schulte-Vennbur
Volksschule	1948 - 1952 in Balve/Westf. und Bad Godesberg
Höhere Schule	1952 - 1958 in Bad Godesberg/Bonn 1958 - 1960 in Washington DC, USA
Bundeswehr	1960 - 1962
Universität	1962 - 1966 in Washington DC, USA (pol. Wissensch., Engl./Franz.) 1966 - 1973 Exportkaufmann in Essen und Würzburg
Reifeprüfung	Januar 1974 in München
Beginn Medizinstudium	1974 Wintersemester in Würzburg
Ärztliche Vorprüfung	August 1976
1. Teil der Ärztlichen Prüfung	März 1978
2. Teil der Ärztlichen Prüfung	März 1980
3. Teil der Ärztlichen Prüfung	April/Mai 1981

Verheiratet seit 1968 mit Hanna Buschmann, 1 Tochter

Jörg Buschmann

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80

Dissertationsdruck
Schmitt & Meyer

Würzburg Ludwigkai 28a Tel. 7 23 80